

STOFFWECHSEL UND AUSSCHIEDUNG
VON FORMALDEHYD, AMEISENSÄURE
UND HEXAMETHYLENTETRAMIN

von

Eva Schlede

1967

Aus dem Institut für Veterinär-Pharmakologie
und -Toxikologie der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr.med. Helmut Kewitz

STOFFWECHSEL UND AUSSCHIEDUNG
VON FORMALDEHYD, AMEISENSÄURE
UND HEXAMETHYLENTETRAMIN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung
der veterinär-medizinischen Doktorwürde
an der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Eva Schlede

Tierärztin
aus Berlin

Berlin 1966

Journal-Nr.548

Gedruckt mit Genehmigung der
Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. J. BOCH

Referent: Prof. Dr. H. KEWITZ

Korreferent: Prof. Dr. Dr. K. DREPPER

Tag der mündlichen Prüfung: 12. 7. 1966

Tag der Promotion: 27. 1967



Inhaltsverzeichnis

	Seite
EINLEITUNG	5
MATERIAL UND METHODIK	8
A. Versuchstiere	8
B. Verwendete Substanzen	8
C. Autoradiografie von Ganztierschnitten	8
D. Bestimmung der Radioaktivität	11
E. Gewinnung und Aufarbeitung der Ausscheidungen und der Organe	13
a) Messung der C-14-Aktivität im Harn	13
b) Messung der C-14-Aktivität im Bariumcarbonat	13
c) Bestimmung der Aktivität im Kot	13
d) Bestimmung der Aktivität in den Organen und im eviscerierten Tierkörper	14
F. Chemische Nachweisverfahren	14
1. Formaldehydbestimmungen	14
a) Formaldehydbestimmung nach LANGECKER	14
b) Formaldehydbestimmung nach ANTONACOPOULOS	16
c) Formaldehydonfällung	17
2. Ameisensäurebestimmung	18
G. Papierchromatografie	23
H. Präparation von Ratten zur fortlaufenden Entnahme von venösem und arteriellem Blut und gleichzeitiger Gewinnung der abgeatmeten Kohlensäure	24
J. Anordnung zur Gewinnung des ausgeatmeten CO ₂ und des getrennten Auffangens von Harn und Kot nach oraler Applikation von radiomarkiertem Hexamethylentetramin	26

ERGEBNISSE

I. Untersuchungen an Ratten nach intravenöser Injektion von radiomarkierter Ameisensäure und radiomarkiertem Formaldehyd	27
1. Ausscheidung von Ameisensäure und Formaldehyd als CO_2	27
2. Elimination mit dem Harn	30
3. C-14-Konzentration im Blut	41
4. Oxydation von Formaldehyd zu Ameisensäure in vitro	46
5. Verteilung der im Blut vorhandenen C-14-haltigen Bestandteile zwischen Plasma und Zellen	49
II. Bilanz- und Verteilungsstudien an Mäusen nach oraler Applikation von radiomarkiertem Hexamin	51
1. Ausscheidung als CO_2	51
2. Elimination mit dem Harn	52
3. Verteilung des radioaktiven Kohlenstoffes im Tierkörper	59
4. Beschreibung der Autoradiogramme von Ganztierschnitten	62
DISKUSSION	72
ZUSAMMENFASSUNG	79
Literatur	81

EINLEITUNG

Die vorliegende Arbeit ist Teil einer Untersuchung über die Duldbarkeit des Konservierungsstoffes Hexamethylentetramin (Hexamin, Urotropin) in Lebensmitteln.

Da Hexamin jedoch schon während der Lagerung hydrolytisch gespalten werden kann, so daß je Molekül Hexamin vier Moleküle Ammoniak und sechs Moleküle Formaldehyd entstehen, und Formaldehyd als der eigentlich wirksame Bestandteil angesehen wird, mußte sich die Untersuchung auch auf den Formaldehyd erstrecken. Das intakte Hexaminmolekül selbst ist nach allem, was bekannt ist, sicher eine wenig reaktionsfähige, im Körper inerte Substanz. Es fragt sich eben nur, wo und unter welchen Bedingungen eine Spaltung eintreten kann, die dann den äußerst reaktionsfreudigen Formaldehyd freisetzt.

Zunächst war zu prüfen, ob Formaldehyd aus dem Magen-Darm-Trakt von Säugetieren resorbiert wird. Darüber gab es zwar Untersuchungen, aber die Ergebnisse waren widersprüchlich. In einer vorangehenden Doktorarbeit hat K.KUSCHINSKY (1) festgestellt, daß Formaldehyd bei der Ratte und bei der Maus innerhalb weniger Stunden vollständig resorbiert wird. Der größte Teil, etwa 40 %, findet sich, zu Kohlensäure oxydiert, in der Ausatemungsluft wieder. 6 - 8 % werden mit dem Harn und ca. 1 - 2 % mit dem Kot ausgeschieden. Der Rest des als Formaldehyd zugeführten radioaktiv markierten Kohlenstoffes blieb relativ lange im Tierkörper zurück, so daß noch nach 4 Tagen etwa 10 % der zugeführten Dosis nachweisbar waren. Bei der Autoradiografie von Ganztierschnitten war die Verteilung in den einzelnen Organen zu demonstrieren.

Diese Untersuchungen mußten nun fortgeführt werden. Die Aufgabe bestand darin, festzustellen, in welcher Weise die Oxydation des Formaldehyds vor sich geht. Es war zu

klären, ob im Blut nachweisbare Mengen von Ameisensäure entstehen, oder ob bei der Oxydation zu CO_2 die Ameisensäure nur eine kurzlebige Zwischenstufe darstellt, die analytisch nicht zu erfassen ist. Nach Möglichkeit sollten Anhaltspunkte über den Ort, an dem die Oxydation stattfindet, beigebracht werden. Dafür kommt in erster Linie das Blut in Frage oder die Leber. Selbstverständlich ist auch die Möglichkeit in Erwägung zu ziehen, daß sich die beiden Oxydationsschritte an getrennten Orten abspielen. Der erste Schritt zur Ameisensäure könnte im Blut ablaufen und der zweite in der Leber. Für das Studium dieser Fragen erschien es notwendig, Formaldehyd zu verwenden, dessen Kohlenstoff mit C-14 markiert ist, so daß die Stoffwechselprodukte aufgrund der Radioaktivität zu erkennen sind. Um festzustellen, ob Ameisensäure nach der Applikation von Formaldehyd im Blut oder im Harn vorkommt, die aus dem applizierten Formaldehyd entstanden ist, mußte eine Methode ausgearbeitet werden, die eine quantitative Bestimmung von Ameisensäure neben Formaldehyd gestattet. Außerdem erschien es nützlich, nicht nur den Stoffwechsel von Formaldehyd, sondern auch den von Ameisensäure zu untersuchen und beide miteinander zu vergleichen. Dazu dienten Experimente mit C-14-markierter Ameisensäure.

Schließlich sollte auch das Verhalten von Hexamin im tierischen Körper studiert werden. Zwar ist seit den Arbeiten von TRENDLENBURG (2) bekannt, daß Hexamin im sauren Magensaft gespalten und der Anteil, der unverseht zur Resorption gelangt, zum größten Teil unverändert ausgeschieden wird, aber eindeutige Untersuchungen am intakten Tier lagen nicht vor. Insbesondere war über die Verteilung von Hexamin im Körper wenig bekannt. Es sollten wenigstens Anhaltspunkte erhalten werden, ob in den Organen eine Hydrolyse vorkommen kann, oder nicht. Wenn in den Organen Formaldehyd abgespalten würde, könnten unphysiologische Formylierungsprodukte in der Zelle

auftreten.

Zur Prüfung der Ausscheidungsprodukte im Harn mußte eine Methode entwickelt werden, mit der sich Formaldehyd in Anwesenheit eines hohen Überschusses von Hexamin bestimmen läßt.

MATERIAL UND METHODIK

A. Versuchstiere

Die Versuche wurden an männlichen und weiblichen Albinomäusen im Gewicht von 18 - 44 g und an weiblichen Albino-ratten im Gewicht von 140 - 155 g durchgeführt.

B. Verwendete Substanzen

1. Radiomarkierter Formaldehyd

Reiner ^{14}C markierter Formaldehyd mit einer spezifischen Aktivität von $423 \mu\text{C}/\text{mg} = 12,7 \text{ mC}/\text{mMol}$ wurde von der New England Nuclear Corporation, Boston, bezogen.

2. Radiomarkiertes Natriumformiat

Das ^{14}C markierte Na-formiat hatte eine spezifische Aktivität von $449 \mu\text{C}/\text{mg} = 30,5 \text{ mC}/\text{mMol}$ und wurde vom Radiochemical Centre, Amersham, bezogen. Der radiochemische Reinheitsgrad betrug 97 %.

3. Radiomarkiertes Hexamethylentetramin

Das mit ^{14}C markierte Hexamin der Firma Hoechst hatte eine spezifische Aktivität von $12,6 \mu\text{C}/\text{mg} = 17,63 \text{ mC}/\text{mMol}$. 5 % der Radioaktivität lagen nach der Hydrolyse nicht in flüchtiger Form, d.h. nicht als freier Formaldehyd vor. Jedoch ist nicht ausgeschlossen, daß während der Hydrolysezeit ein Teil des Formaldehyds polymerisiert.

C. Autoradiografie von Ganztierschnitten nach

ULLBERG (3)

Dieses Verfahren eignet sich für das Studium der Verteilung von radioaktiv markierten Verbindungen im Körper.

Zu verschiedenen Zeiten nach der Applikation wird das ganze Tier in Längs- oder Querschnitte zerlegt, die auf Röntgenfilm gepreßt werden, der an den Stellen, an denen die Strahlung auftrifft, nach dem Entwickeln eine Schwärzung aufweist. Die notwendige Expositionszeit ist um so kürzer, je energiereicher die Strahlung ist. Dagegen ist die Auflösung und die Schärfe der Bilder um so besser, je kleiner die Reichweite ist, d.h. je weniger Energie die ausgestrahlten Teilchen besitzen. Nach Möglichkeit sollten nur die unmittelbar an der Schnittoberfläche liegenden radioaktiven Elemente eine Schwärzung verursachen und die aus den tieferen Schichten stammenden Elektronen schon in den darüberliegenden Gewebsteilen absorbiert werden. Deshalb eignen sich nicht alle Radioisotope für diese Form der Autoradiografie. Kohlenstoff mit der Massenzahl 14 sendet β -Teilchen aus, deren kinetische Energie gerade so groß ist, daß ein ausreichend scharfes Schwärzungsbild entsteht, das einem Abbild der Gewebsstruktur gleicht.

Bei dieser Technik muß jedoch stets berücksichtigt werden, daß die Schwärzung nur angibt, wo das radioaktive Element liegt, aber nicht in welcher Verbindung es enthalten ist.

Infolgedessen liefert das Verfahren nur dann brauchbare Resultate, wenn durch chemische Analysen gleichzeitig festgestellt wird, ob und in welcher Weise die zugeführte Substanz im Organismus verändert worden ist.

Zur Anfertigung der Schnitte werden die Tiere, entweder Mäuse oder Ratten, mit Äther narkotisiert und dann in einer tiefgekühlten Flüssigkeit eingefroren. Dazu kann Aceton verwendet werden, das durch Zufügen von fester Kohlensäure auf -70°C gebracht wird. Wenn keine Vorkehrungen getroffen werden, krümmt sich beim Eintauchen des Tierkörpers in die kalte Lösung der Rücken. Dadurch würde eine, für die spätere Beurteilung der Schnitte, ungünstige Kompression der Bauchorgane eintreten. Deshalb müssen

die Tiere in gestreckter Körperhaltung eingefroren werden, indem sie zwischen dem Kopf und dem Schwanzende mit einer Zange gestreckt werden. Der eingefrorene Körper wird nun in eine wässrige Suspension von Carboxylmethylcellulose eingebettet und kann nach Entfernen der vorstehenden Extremitätenenden in Schnitte zerlegt werden. Dazu wurde ein großes Mikrotom der Firma Jung verwendet, das die Bezeichnung "K-Mikrotom" trägt. Die Schnitte sind 30 - 50 μ dick und werden, damit sie sich besser handhaben lassen, auf einen durchsichtigen Tesafilmstreifen aufgezogen. Der Klebestreifen wird schon vor der Anfertigung des einzelnen Schnittes auf die Oberfläche gelegt, so daß der daran klebende Schnitt auf diese Weise abgehoben werden kann. Der Schnitt bleibt dann ein oder zwei Tage offen im Kühlraum bei -12 bis -15 °C liegen, bis er trocken ist, oder er wird in einem Exsiccator etwas schneller und ausgiebiger getrocknet.

Danach erfolgt die Anfertigung der Radiografie. Film und Schnitt müssen dabei möglichst innigen Kontakt haben. Das läßt sich durch Aneinanderpressen mit einer Schraubzwinge erreichen.

Zur ersten Orientierung über die notwendige Expositionszeit dient ein grobkörniges, relativ unempfindliches Filmmaterial. Für die endgültige Autoradiografie wurde Mikrofilm der Sorte 1 und 2 der Firma Schleussner verwendet. Die Expositionsdauer betrug je nach der Strahlungsdichte 4 - 10 Wochen. Dann wurden die Schnitte vom Film genommen und der Film mit handelsüblichen Röntgen-Rapid-Entwickler 5 Minuten entwickelt, anschließend fixiert und gewässert.

D. Bestimmung der Radioaktivität

Die Bestimmung der Radioaktivität in den Ausscheidungen und in den Organen erfolgte mit einem Flüssigkeits-Scintillationsgerät "Tri-Carb", Modell 526, der Firma Packard.

Das Gerät war für die C-14-Messung so eingestellt, daß die energiearmen Teilchen nicht registriert wurden. Das Potentiometer des Discriminators wurde auf den Bereich 40 - 1 000 Teilstriche limitiert. Die Spannung an den Elektronenvervielfachern betrug 3485 Volt.

Als Scintillatorflüssigkeit diente eine Lösung von

50 mg Dimethyl-POPOP [1,4- bis -2(4-Methyl-5-Phenyl-oxazolyl) Benzol] und

4 g PPO(2,5 Diphenyloxazol)

in einem Liter Toluol = "Scintillatortoluol".

In jedes Zählglas wurden 8 ml Scintillatortoluol, 2 ml Alkohol und die zu messende Probe gegeben.

War die Probe in Wasser gelöst und mußte darum mehr als 0,1 ml zugegeben werden, war es günstiger an Stelle von Toluol das mit Wasser mischbare Dioxan zu verwenden. In einem Liter waren

100 g Naphthalin

10 g PPO

25 mg Dimethyl-POPOP

gelöst = "Scintillatordioxan".

Zur Messung der in den Scintillatorflüssigkeiten unlöslichen Proben mußten Suspensionen hergestellt werden, die mit Hilfe von 400 mg thixotropem Gel (Cab-O-Sil der Firma Packard) stabilisiert wurden. Auf diese Weise erfolgte die Messung von Gewebshomogenaten, von Kot und Bariumcarbonat.

Bei der Bestimmung der radioaktiven Zerfälle durch Zählung der Lichtblitze in einer Scintillatorflüssigkeit ist die Ausbeute durch Absorption von Elektronen oder von Lichtquanten innerhalb der Lösung herabgesetzt. Da diese

als "quenched" bezeichnete Differenz zwischen der Zahl der registrierten Impulse und der Zahl der tatsächlichen Transmutationen von der jeweiligen Zusammensetzung der einzelnen Proben abhängt, muß die Zählkreisbeute besonders ermittelt werden. Das kann durch zwei verschiedene Verfahren geschehen. Erstens läßt sich feststellen, wieviel Prozent der Transmutationen gezählt werden, wenn radioaktives Toluol mit bekannter Zerfallsrate zugesetzt wird. Zweitens kann ein γ -Strahlen aussendendes Isotop, z.B. Caesium-137, so in die Nähe des Probengläschens gebracht werden, daß die Strahlung die Glaswand durchdringt und in der Lösung Lichtblitze auslöst, die je nach Zusammensetzung mit verschiedener Ausbeute registriert werden. Bei dem ersten Verfahren wird mit einem "internen Standard", bei dem letzteren mit einem "externen Standard" gearbeitet. Beide Methoden wurden zur Ermittlung der Ausbeute herangezogen.

Die Berechnung der Ausbeute ergibt sich nach

$$A = \frac{(Ipm)_p - (Ipm)_a}{(Tpm)_{St}}$$

$(Ipm)_p$ = Nettoimpulsrate nach Zusatz einer bekannten C-14-Menge

$(Ipm)_a$ = Nettoimpulsrate vor Zusatz der bekannten C-14-Menge

$(Tpm)_{St}$ = Zerfallsrate in der zugesetzten Menge C-14-Toluol

Daraus läßt sich die Zerfallsrate (Tpm) jeder Probe berechnen nach

$$Tpm = \frac{(Ipm)_a}{A}$$

E. Gewinnung und Aufarbeitung der Ausscheidungen und
der Organe für die Messung der Radioaktivität

a) Messung der C-14-Aktivität im Harn

Die Bestimmung der Harnmengen, die mittels Katheter in Fraktionen aufgefangen wurden, erfolgte durch Wägen oder Abmessen des Volumens. Nach Auffüllung mit aqua dest. ad 10 ml diente ein aliquoter Teil zur Messung der darin enthaltenen Radioaktivität.

b) Messung der C-14-Aktivität im Bariumcarbonat

Die Ausatemungsluft wurde durch gesättigte Bariumhydroxydlösung gesaugt, in der Kohlendioxyd als Bariumcarbonat ausfällt. Die Bariumhydroxydlösung befand sich in zwei hintereinander geschalteten Waschflaschen, in die Glasfritten eintauchten, die für eine sehr feinperlige Verteilung der durchströmenden Luft sorgten. Der Niederschlag wurde auf Glasfilter G 4 abgenutscht und anschließend bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nach Zerreiben des trockenen Bariumcarbonates wurden für drei Parallelbestimmungen jeweils 2 - 10 mg für die Messung der Radioaktivität entnommen. Nachdem sich herausgestellt hatte, daß die gesamte Radioaktivität als Carbonat darin enthalten war, wurde der Niederschlag nicht mehr abgetrennt, sondern zur Vereinfachung und Beschleunigung der Analysen direkt die Suspension verwendet und nach kräftigem Aufschütteln eine Probe mit der Pipette entnommen. Mehrfache Bestimmungen zeigten, daß eine ausreichend homogene Verteilung vorhanden war.

c) Bestimmung der Aktivität im Kot

Kot, in dem die Radioaktivität bestimmt werden sollte, wurde gewogen und dann mit Wasser oder Dioxan homogenisiert und so zur Messung eingesetzt.

Ein einmal von einer Maus zufällig gewonnenes Ejakulat konnte in gleicher Weise zur Bestimmung bereitet werden.

d) Bestimmung der Aktivität in den Organen und im eviscerierten Tierkörper

Die Organe wurden entweder in 20 %iger äthanolischer KOH hydrolysiert oder im Potter-Elvehjem-Homogenisator mit Wasser homogenisiert. Ein Aliquot dieses Homogenates, zur Stabilisierung mit thixotropem Gel versetzt, diente zur Messung der Radioaktivität.

Der eviscerierte Tierkörper wurde unter Zusatz von 40 ml Wasser homogenisiert und die nicht homogenisierbaren Bestandteile - Sehnen, Haut und Knochen - mußten aus dem Homogenat durch ein feinmaschiges Sieb entfernt und bei 80 °C in 20 %iger KOH am Rückflußkühler hydrolysiert werden. Der nicht in KOH lösliche Rückstand wurde in einem Widmarkkolben mit 6 n HCl übergossen. In dem Löffel befand sich 20 %iges Hyamin. Das C-14 trat dann als CO₂ in die Hyaminlösung über und konnte in dieser Form direkt gemessen werden.

F. Chemische Nachweisverfahren

1. Formaldehydbestimmungen

a) Formaldehydbestimmung im Widmarkkolben nach LANGECKER (4)

Mit dieser Methode kann frei in Lösung vorliegender Formaldehyd bestimmt werden. Hexamin läßt sich quantitativ erfassen, wenn die Probe angesäuert wird, so daß Hydrolyse eintritt und Formaldehyd freigesetzt wird.

Reagenzien:

1. 20 mg chromogene Säure (1,8 Dihydronaphthalin-3,6-di-sulfonsaures Natrium) in 0,4 ml Wasser gelöst und mit 15 molarer Schwefelsäure auf 100 ml aufge-

füllt ist stets frisch zubereitet.

2. 1,5 %ige und 7,5 %ige Weinsäure

0,1 - 1,0 ml der Probe wurde in den Löffel eines Widmarkkolbens eingefüllt und 1 ml 1,5 %ige oder 0,2 ml 7,5 %ige Weinsäure zugegeben. In dem Widmarkkolben befanden sich 10 ml von Reagenz 1. Dieser Ansatz blieb über Nacht bei 60 °C stehen. Durch Aufnahme von Formaldehyd entsteht in der Schwefelsäure-Chromogensäure-Lösung ein Farbstoff, dessen Extinktion im Eppendorf-Photometer mit dem Filter 578 nm Hg gemessen werden kann. Nach 8 Stunden ist der Formaldehyd vollständig in die Chromogensäure übergetreten. Der Anteil, der im Löffel zurückblieb, ist nicht Formaldehyd und kann in Wasser aufgenommen und auf seinen Gehalt an Radioaktivität untersucht werden.

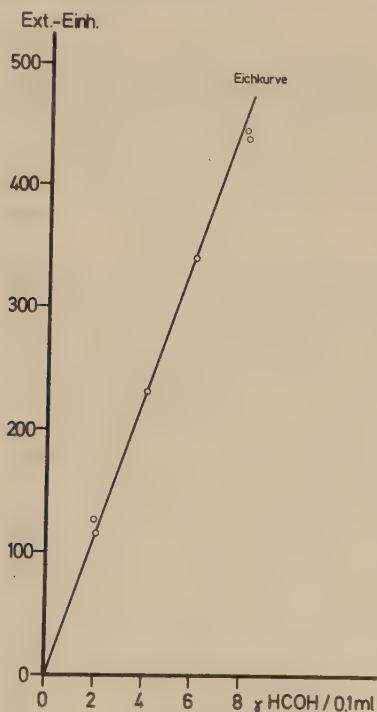


Abb. 1: Eichreihe Formaldehyd aus Hexamin in der Methode nach LANGECKER

b) Bestimmung nach ANTONACOPOULOS (5)

Bei der Überprüfung, ob Formaldehyd in der Ausatemungsluft enthalten ist, wurde die Methode von ANTONACOPOULOS verwendet.

Die Reagenzien sind bis auf die geringer konzentrierte Schwefelsäure die gleichen wie bei der Bestimmung im Widmarkkolben.

500 mg chromogene Säure werden in 50 ml Wasser gelöst und ad 100 ml mit 70 %iger Schwefelsäure aufgefüllt. Für die Analyse wird 1 ml dieser Lösung mit 8 ml 70 %iger Schwefelsäure und 1 ml Probenlösung zusammengegeben. Der Farbstoff entwickelt sich im Laufe von 20 Minuten bei der Temperatur des siedenden Wasserbades. Die Messung erfolgte ebenfalls mit dem Filter 578 nm Hg.

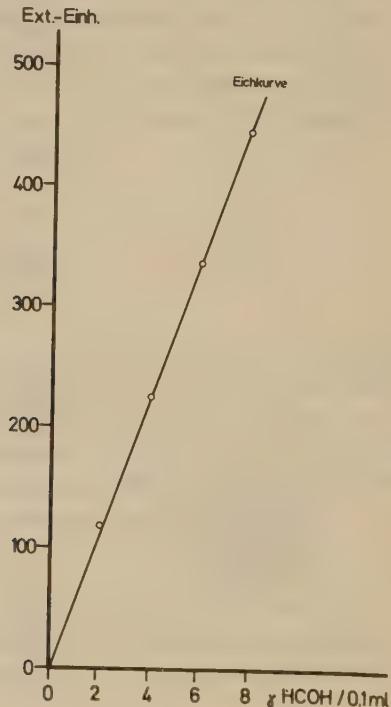


Abb. 2: Eichreihe Formaldehyd in der Methode nach ANTONACOPOULOS

c) Formaldomedonfällung

2 Mol Dimedon (Dimethyl-dihydroresorcin) reagieren mit 1 Mol Formaldehyd, und es entsteht das Kondensationsprodukt Formaldimedon, das im Sauren unlöslich ist und sich niederschlägt. Die Reaktion selbst findet in alkalischen als auch in sauren Lösungen statt. Auf diese Weise kann Formaldehyd in Gegenwart von Hexamin bestimmt werden. Das ist mit den vorher erwähnten Verfahren nicht möglich, weil das Hexamin zu leicht gespalten wird und Formaldehyd freisetzt.

Reagenzien:

1. 10 %ige Essigsäure
2. gesättigte Natriumcarbonatlösung
3. 0,4 %ige Dimedonlösung

Zu 2 ml der Probenlösung werden in Gläsern mit eingeschliffenen Stopfen 1 Tropfen Natriumcarbonatlösung gegeben, anschließend 0,1 ml 10 %ige Essigsäure und 0,1 ml 0,4 %ige Dimedonlösung. Die Probenlösung hatte einen pH-Wert von 4. Bei Zimmertemperatur blieben die Proben ca. 24 Stunden stehen (6).

Auf einem Glasfilter G 4 wird der Niederschlag durch Abnutschen gesammelt. Der Niederschlag, der als Formaldomedon vorlag, löst sich in Dioxan. Bei Versuchen mit radiomarkiertem Formaldehyd und radiomarkiertem Hexamin ergaben sich die in Tabelle 1 aufgeführten Werte.

Eingesetzte Menge ^{14}C in Tpm $\cdot 10^4$		% als Form- aldehyd	Wiedergefundene Menge ^{14}C im Niederschlag in Tpm $\cdot 10^4$	% der ein- gesetzten ^{14}C -Menge
Als Form- aldehyd	als Hexamin			
9,49			8,76	92,3
9,49			8,70	92,0
	34,2		5,90	17,2
	34,2		6,60	19,3
4,74	17,1	22	6,70	30,8
4,74	17,1	22	7,47	34,2

Daraus ist ersichtlich, daß 92 % des Formaldehyds als Formaldomedon ausgefällt werden und im Niederschlag vorliegen. Aus reiner Lösung von Hexamin werden knapp 20 % ausgefällt. Aus Lösungen, die Formaldehyd und Hexamin im Verhältnis 1 : 3,5 enthalten, das ungefähr dem im Harn vorkommenden entspricht, befinden sich statt 22 % ca. 32 % der radiomarkierten Bestandteile im Niederschlag. Daher mußten die Ergebnisse der Harnanalysen durch Abzug von $1/3$ korrigiert werden.

2. Ameisensäurebestimmung

Zur quantitativen Bestimmung der Ameisensäure und zur Ermittlung ihrer Radioaktivität wurde mit Hilfe von Diazomethan der Methylester gebildet und aus diesem mit Hydroxylamin im alkalischen Milieu die Formhydroxamsäure hergestellt, die im sauren pH-Bereich einen rotbraun gefärbten Komplex mit Eisen-III-chlorid bildet, der sich für eine kolorimetrische Bestimmung eignet.

Da die zu analysierende Menge von Ameisensäure in Blut und Harn zu gering war und es vorwiegend darauf ankam, die in der Ameisensäure enthaltene Radioaktivität zu er-

fassen, wurden jedem Ansatz 5 μmol nicht radioaktive Ameisensäure zugesetzt. Als Leerwerte dienten gleiche Mengen an Harn und Blut. Die Aufstellung der Eichkurve (Abb. 3) erfolgte mit authentischem Ameisensäuremethylester der Firma Riedel-de Haën.

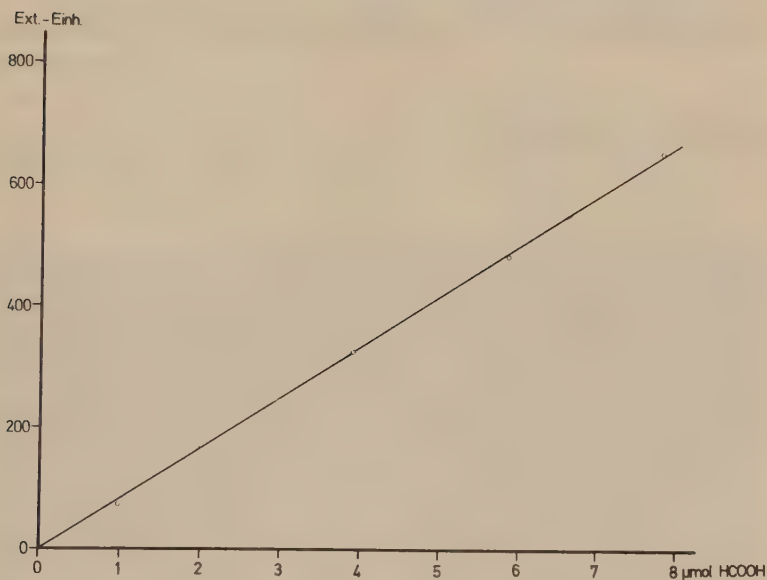


Abb. 3: Eichreihe für die Ameisensäurebestimmung

Reagenzien:

1. Na-formiat ($10 \mu\text{mol}/0,1 \text{ ml}$)
2. $0,2 \text{ n NaOH}$
3. Äther p.a.
4. $10 \text{ n H}_2\text{SO}_4$
5. Natriumsulfat, wasserfrei
6. Diazomethan

7. 0,5 molare äthanolische Hydroxylammoniumchloridlösung mit dem doppelten Volumen 2 n äthanolische KOH gemischt und kurz vor Gebrauch frisch zubereitet. Der dabei entstehende KCl-Niederschlag wurde abfiltriert.
8. gesättigte äthanolische Amidosulfonsäurelösung
9. 10,7 %ige HCl
10. 0,37 m Eisen-III-chloridlösung in 0,1 n HCl

Ausführung der Analyse

10 - 20 μ l Harn oder 10 - 20 μ l Blut wurden 5 μ mol inaktives Na-formiat zugesetzt und mit 0,2 n NaOH auf pH 9 gebracht und dann eingetrocknet.

Der trockene Rückstand wurde im Eisbad zunächst mit 0,5 ml Äther überschichtet und dann mit 40 - 70 μ l 10 n H_2SO_4 angesäuert. Beim Durchmischen beider Phasen mit dem Glasstab geht die Ameisensäure in den Äther über. Nach dem Abheben des Äthers wurde noch 5 mal mit Äther nachgewaschen. Das entstandene Natriumsulfat blieb als feiner Niederschlag zurück. Die vereinigten ätherischen Auszüge müssen nun mit Natriumsulfat getrocknet werden, bevor zur Überführung in den Methylester Diazomethanolösung bis zur Gelbfärbung des Ansatzes zugesetzt wird. Die gelbe Farbe des Diazomethan muß auch noch nach 30 Minuten Stehen im Kühlschrank bei 2 - 4 °C erhalten bleiben. Dann ist die Reaktion abgeschlossen. Mit 0,2 ml Hydroxylaminlösung erfolgt nun die Bildung der Hydroxamsäure. Durch Zusatz von 1,6 ml gesättigter äthanolischer Amidosulfonsäurelösung wird das in Lösung gebliebene Kalium gefällt und abzentrifugiert. Der Überstand wird eingeengt.

Als ätherlöslich störende, weil ebenfalls radiomarkierte Substanzen, die bei diesem Verfahren ebenso extrahiert werden, kommen Harnstoff und Allantoin in Frage.

Voraussetzung war daher eine saubere Trennung von der Formhydroxamsäure.

Mit Hilfe der Papierchromatografie war keine ausreichende Trennung von Harnstoff und Formhydroxamsäure zu erreichen. Dafür eignete sich jedoch die Dünnschichtchromatografie. Glasplatten erhielten einen Belag mit MN-Cellulosepulver der Firma Macherey, Nagel & Co., der kurz vor Gebrauch 10 Minuten bei 105 °C erhitzt worden war. Als Fließmittel diente ein Gemisch aus 3 Teilen wassergesättigtem n-Amylalkohol mit 0,5 ml Eisessig und 1 Teil Methanol.

Nach der Trennung wurde das Chromatogramm mit Eisen-III-chlorid-Lösung besprüht. Der Eisen-III-Komplex der Formhydroxamsäure markierte sich als rotbrauner Fleck. Mit

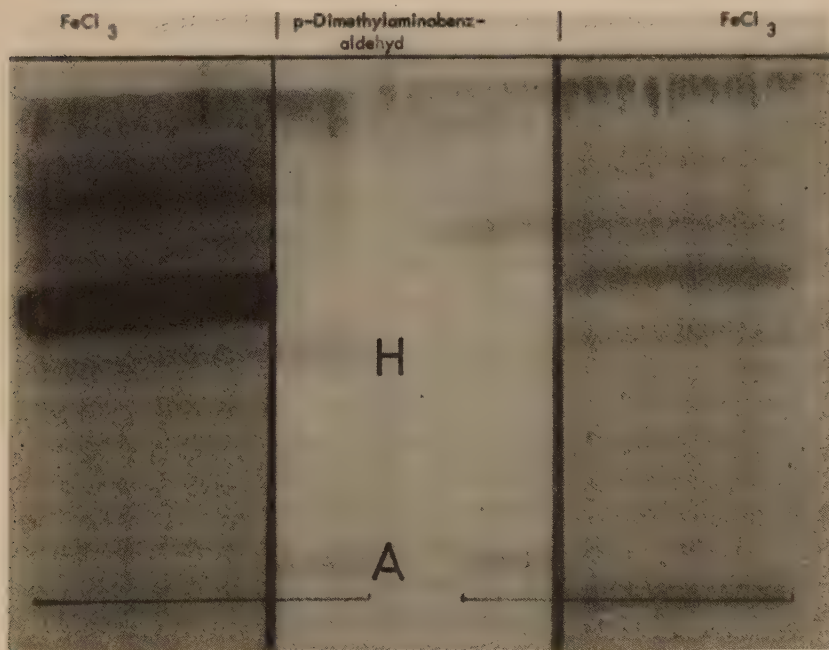


Abb. 4: Dünnschichtchromatogramm der Formhydroxamsäure (links) und eines Leerwertes (rechts). An den Seiten Anfärbung mit Eisen-III-chlorid, in der Mitte mit Dimethylaminobenzaldehyd.
A = Allantoin, H = Harnstoff

einem Spatel wurde an dieser Stelle die Cellulose vorsichtig von der Glasplatte abgeschabt und mit Wasser ausgewaschen. Nach Abnutschen durch ein G-4-Glasfilter wird das Eluat auf 3 ml mit Aqua dest. aufgefüllt und für die Messung der Radioaktivität 0,5 ml entnommen. Danach wird erneut auf 3 ml aufgefüllt und nun mit 1 ml 10,7 %iger HCl angesäuert. Durch Zugabe von 1 ml 0,37 molarer Eisen-III-chloridlösung in 0,1 n HCl wird der gefärbte Komplex gebildet (7). Die Ermittlung der Extinktion erfolgte in 1 cm Cuvetten mit dem Zeiss-Spectralphotometer PMQ II bei 510 nm.

In der Regel wurden 65 - 75 % der eingesetzten Ameisensäure wiedergefunden.

eingesetzt pro Ansatz	Ansatz	gefunden			
		mit Hilfe der Farbmessung		mit Hilfe der ¹⁴ C-Messung	
		umol	%	Tpm · 10 ³	%
5 umol	1	3,73	74,6	34,55	74,5
Ameisensäure plus	2	3,33	66,6	35,59	76,8
46,36 · 10 ³ Tpm	3	3,25	65,0	34,33	74,1
¹⁴ C-markiertes Na-formiat	4	3,49	69,8	36,27	78,2
			69,0 ± 4,23		75,75 ± 1,86

Tab. 2

Die Tabelle 2 zeigt die in Versuchen ermittelte Ausbeute der eingesetzten Ameisensäure und einer bekannten Menge an radiomarkierter Ameisensäure. Die Ausbeute bei der chemischen Bestimmung war geringer als bei der Ermittlung der Radioaktivität. Diese Differenz wurde bei den späteren Versuchen nicht berücksichtigt.

G. Papierchromatografie

Zur Papierchromatografie wurde Papier der Firma Schleicher und Schüll Nr. 2043 B verwendet, das mit 1 n Schwefelsäure, anschließend mit Aqua dest. und dann mit 10 n Ammoniak und nochmals mit Aqua dest. gewaschen worden war. Vor der Verwendung erfolgte noch eine Waschung mit dem vorgesehenen Lösungsmittelgemisch.

Folgende Lösungsmittel kamen zur Verwendung:

1. sauer: n-Butanol, n-Propanol, Äthanol, Ameisensäure, Wasser im Verhältnis
6 : 2 : 1 : 1 : 2.
2. alkalisch: n-Propanol, 25 %iger Ammoniak, Wasser im Verhältnis 6 : 1 : 3.
3. neutral: n-Propanol und 0,8 molare Ammonacetatlösung im Verhältnis 4 : 1.

Zur Entwicklung dienen:

1. Ninhydrin, 200 mg gelöst in 95 ml Butanol und 5 ml Eisessig.
2. p-Dimethylaminobenzaldehyd (D.A.B.), 1 g gelöst in 95 ml Äthanol und 5 ml konzentrierter HCl.

Mit diesen Reagenzien wurden die Chromatogramme besprüht. Ninhydrin ist ein Reagenz auf primäre Aminogruppen, das besonders zum Nachweis von Aminosäuren verwendet wird. Dimethylaminobenzaldehyd ergibt beim Zusammentreffen mit Harnstoff oder mit Allantoin, aber auch mit anderen Ketonen, einen gelben Farbstoff.

Außerdem wurden von Chromatogrammen mit Röntgenfilm der Firma Gevaert Autoradiogramme angefertigt. Die Expositionszeit betrug 1 - 4 Wochen. Danach wurden die Röntgenfilme entwickelt und fixiert. Aus den Rf-Werten in verschiedenen Lösungsmitteln, sowie aus der Anfärbbarkeit mit Ninhydrin und Dimethylaminobenzaldehyd und aus der

Übereinstimmung der Form der Flecke im Autoradiogramm und nach Anfärbung konnten Schlüsse auf die Identität gezogen werden.

H. Präparation von Ratten zur fortlaufenden Entnahme von venösem und arteriellem Blut und gleichzeitiger Gewinnung der abgeatmeten Kohlensäure

Weibliche Albinoratten im Gewicht von 140 - 155 g wurden in Urethannarkose, hervorgerufen durch intraperitoneale Injektion von 0,5 ml einer 25 %igen Lösung/100 g, in Rückenlage auf einem Operationsbrett befestigt.

Dann erfolgte durch Längsschnitt der Haut in Halsmitte die Freilegung der Trachea, in die unterhalb des Schildknorpels ein Plastikschauch passender Größe eingelegt und mit Zwirnsfäden befestigt wurde. Nach Einstechen einer Injektionskanüle in den Schlauch kurz über der Stelle, an der dieser in die Trachea einmündet, konnte durch einen kontinuierlichen Sog an dem Plastikschauch bei offener Kanüle ein geringer Unterdruck erreicht werden, der dafür sorgte, daß die ausgeatmete Luft ohne Verlust in Waschflaschen geleitet wurde, wo sie, durch Glasfritten fein verteilt, durch gesättigte Bariumhydroxydlösung perlte. Dabei fällt die Kohlensäure als Bariumsalz aus und kann durch Filtration gewonnen werden. Eine Fraktionierung der Kohlensäure nach der Zeit ist durch die Frequenz des Auswechselns der Bariumhydroxydlösung in den Waschflaschen möglich.

Die Blutentnahme erfolgte aus der Arteria subclavia sinistra und aus der Vena jugularis externa, in die zu diesem Zweck passende Plastikschräuche eingelegt wurden, die je mit einem Hahn versehen waren, über die das Blut in genau bemessenen Zeitabständen in Kapillarröhrchen aufgefangen wurde. Die in die Vene eingelegte Kanüle

wurde bis in die Vena cava cranialis vorgeschoben, und zwar bis zur Höhe des rechten Vorhofes, damit bei der Entnahme nach Möglichkeit gemischtes Blut aus dem Kopf und aus dem übrigen Körper erhalten wurde. Zur Verhinderung der Blutgerinnung erhielten die Tiere kurz vor Versuchsbeginn 10 mg/kg Heparin intravenös. Die radiomarkierten Lösungen wurden, in nicht mehr als 0,5 ml gelöst, in die Schwanzvene injiziert, durch die die Tiere, schon 3 Stunden vorher beginnend, je Stunde kontinuierlich 3,6 ml/100 g einer 4,3 %igen Glucoselösung mit 0,2 % NaCl bekamen. Dadurch war bei Versuchsbeginn eine gleichmäßige Diurese erreicht worden, die eine rasche Ausscheidung der im Blut befindlichen niedermolekularen Stoffe, wie Formaldehyd oder Ameisensäure, herbeiführen sollte. Jedoch konnte der Harn dieser Tiere, wie sich herausstellte, nicht zur Analyse verwendet werden, wenn Heparin gegeben werden mußte, weil der Harn bald nach der Heparingabe Erythrocyten enthielt, so daß die in solchem Harn gefundenen Stoffe infolge von Blutungen aus der Schleimhaut der ableitenden Harnwege dorthinein gelangt sein könnten, also nicht zu entscheiden ist, ob es sich um Harnbestandteile handelt oder nicht.

Deshalb wurden die Harnproben dann von Tieren genommen, bei denen keine Blutentnahme erfolgte. In der Blase befand sich ein Katheter, so daß der Harn in gleichmäßigen Portionen aufgefangen werden konnte.

J. Anordnung zur Gewinnung des ausgeatmeten CO₂ und des
getrennten Auffangens von Harn und Kot nach oraler
Applikation von radiomarkiertem Hexamethylenetetramin

Um von einer Maus während einiger Stunden Harn und Kot getrennt aufzufangen und die Ausatemungsluft zur Fällung der Kohlensäure durch Bariumhydroxydlösung zu leiten, wurde das Tier in einem, seinem Körperumfang angepaßten Plexiglasrohr immobilisiert. Die Hinterextremitäten waren mit Hilfe von 2 kleinen Metallstäben fixiert und der Schwanz nach oben befestigt. Eine Querleiste am Ende des Käfigs ermöglichte ein getrenntes Auffangen von Harn und Kot.

Die Ausatemungsluft wurde zusammen mit der durch den Käfig strömenden Luft vorne am Käfig über einen Trichter abgesaugt und mit Hilfe von Glasfritten fein verteilt durch Bariumhydroxydlösung geleitet, die sich in zwei hintereinander angeordneten Waschflaschen befand.

Die Entleerung der Blase erfolgte durch elektrische Reizung an der Schwanzwurzel mit Rechteckimpulsen von 5 msec bei 100 Hertz und 3 mA. Kurz vor Versuchsbeginn wurde 1 ml physiologische Kochsalzlösung subcutan gespritzt.

Um zu überprüfen, ob nach oraler Gabe von Hexamin in der Ausatemungsluft Formaldehyd erscheint, wurde bei Mäusen, die eine Narkose durch eine intraperitoneale Injektion von 1,5 ml einer 10 %igen Urethanlösung/100 g erhalten hatten, eine Tracheotomie durchgeführt und ein Plastikschlauch in die Trachea eingelegt. Dadurch sollte verhindert werden, daß eventuell mit dem Speichel sezernierter Formaldehyd eine Ausscheidung dieser Substanz durch die Lunge vortäuschen konnte. Der Plastikschlauch hatte in Höhe des Halses ein T-Stück, durch den einerseits Luft zugeführt wurde und an der anderen Seite infolge eines geringen Soges die Ausatemungsluft durch eine Lösung perlte, wie sie für die Bestimmung von Formaldehyd nach ANTONACOPOULOS (5) verwendet wird.

ERGEBNISSE

I. Untersuchungen an Ratten nach intravenöser Injektion von radiomarkierter Ameisensäure und radiomarkiertem Formaldehyd

1. Ausscheidung von Ameisensäure und Formaldehyd als CO₂

Oral zugeführter Formaldehyd wird im tierischen Organismus, wie KUSCHINSKY (1) in früheren Untersuchungen festgestellt hat, zum überwiegenden Teil oxydiert, so daß 40 % in Form von Kohlensäure in der Ausatemungsluft zu finden sind. Die Oxydation muß innerhalb weniger Minuten vor sich gehen. Dabei sollte als Zwischenstufe Ameisensäure auftreten. Um zu erfahren, wie schnell die Ameisensäure aus dem Blut eliminiert wird, wurde deren Ausscheidung mit Hilfe von ¹⁴C-markierter Ameisensäure untersucht.

Die Kurven in Abb. 5 zeigen den Verlauf der Ausscheidung von ¹⁴C-haltigem CO₂ mit der Ausatmung während der ersten beiden Stunden nach der intravenösen Applikation von radiomarkierter Ameisensäure und von radiomarkiertem Formaldehyd bei der Ratte. Die beiden Ausscheidungskurven sind fast deckungsgleich. Beide haben in der ersten halben Stunde die größte Steilheit. In Untersuchungen an Mäusen, deren Ergebnis in Abb. 6 dargestellt sind, sollte ermittelt werden, ob die Art der Applikation einen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Oxydation von Ameisensäure ausübt. Die markierte Ameisensäure wurde oral, intraperitoneal und intravenös zugeführt. Die Steilheit der Kurven, die die Ausscheidung von ¹⁴C in Form von CO₂ mit der Ausatemungsluft wiedergeben, sind bei den drei Applikationsarten unter Berücksichtigung der biologischen Streuungen als gleich zu betrachten. Somit ist nicht

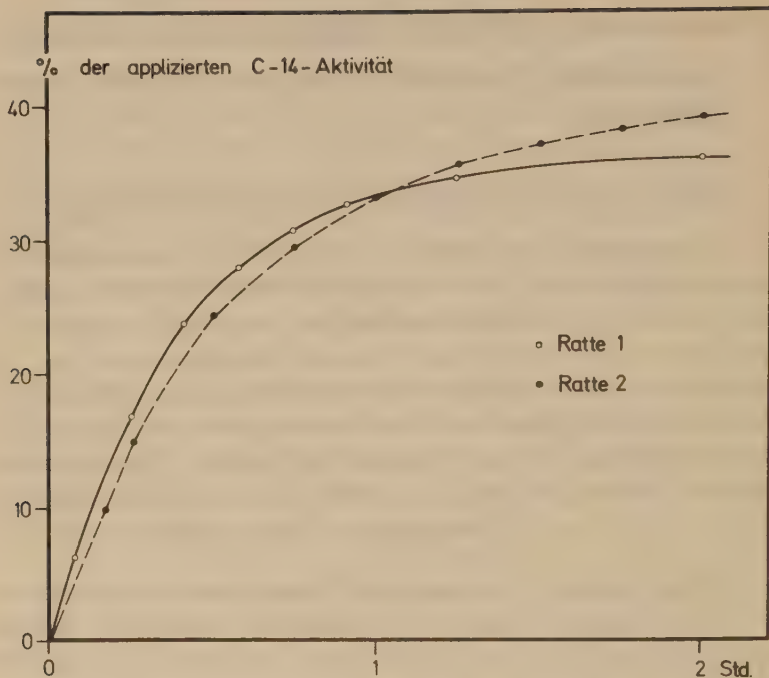


Abb. 5: $^{14}\text{CO}_2$ in der Ausatemungsluft nach intra-venöser Injektion von radiomarkierter Ameisensäure und radiomarkiertem Formaldehyd.

Ratte 1 (♀, 140 g) erhielt $195 \cdot 10^6$ T.p.m./Tier = 1,4 mg ^{14}C -Ameisensäure/kg

Ratte 2 (♀, 147 g) erhielt $118 \cdot 10^6$ T.p.m./Tier = 0,85 mg ^{14}C -Formaldehyd/kg

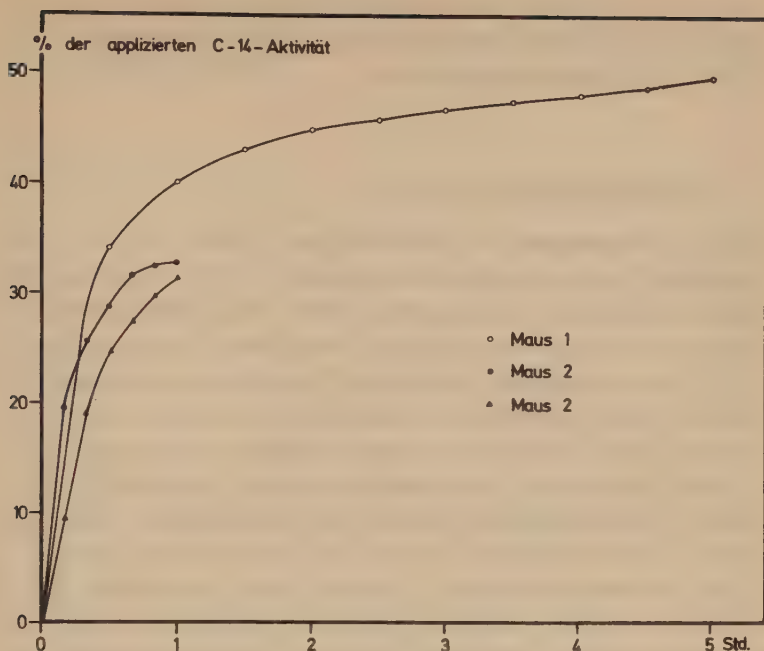


Abb. 6: $^{14}\text{CO}_2$ in der Ausatemungsluft nach oraler, intravenöser und intraperitonealer Applikation von radiomarkierter Ameisensäure bei Mäusen.

Maus 1 (♂, 22 g) erhielt oral $55,5 \cdot 10^6$ T.p.m./Tier = 2,3 mg/kg

Maus 2 (♂, 24 g) erhielt intravenös (•) $49 \cdot 10^6$ T.p.m./Tier = 2,1 mg/kg

Das gleiche Tier erhielt intraperitoneal (▲) $47 \cdot 10^6$ T.p.m./Tier = 1,96 mg/kg.

anzunehmen, daß beim Durchgang durch die Darmwand ein wesentlicher Anteil oxydiert wird.

Als zweiter Ausscheidungsweg, der für die abzugebenden Mengen viel geringere Bedeutung hat, mußte der Harn

analysiert werden, aus dessen niedermolekularen Bestandteilen in gewissem Umfange auf deren Vorhandensein im Blut geschlossen werden kann.

2. Elimination mit dem Harn

Aus den Diagrammen der Abbildungen 7 und 8 ist die Ausscheidung von radioaktivem Kohlenstoff mit dem Harn bei Ratten nach der intravenösen Zufuhr von radioaktiver Ameisensäure und von radioaktivem Formaldehyd zu entnehmen. Die in den einzelnen, nach der Injektion aufgefangenen Harnportionen enthaltene Radioaktivität ist in % von der verabfolgten Dosis aufgetragen. Außerdem wurde in jeder Fraktion der Anteil der Radioaktivität ermittelt, der in Form von Ameisensäure vorlag. Das schraffierte Areal gibt wieder, welcher Anteil der injizierten Dosis als Ameisensäure ausgeschieden wird, während das nicht schraffierte Areal wiedergibt, welcher Anteil in andere Verbindungen überführt worden ist oder im Falle des Formaldehyds nicht in Ameisensäure umgewandelt wurde. Die beiden Diagramme stimmen in vieler Hinsicht überein. Das Maximum der Ausscheidung liegt in beiden Fällen zwischen 3 und 6 Minuten. In den ersten 5 bis 7 Minuten ist die Radioaktivität vorwiegend in der Ameisensäure enthalten, jedoch ergab sich hier ein Unterschied zwischen den beiden Versuchen. Nach der Gabe von Formaldehyd wurde in der ersten Minute der weitaus größere Teil der Radioaktivität nicht in Form von Ameisensäure ausgeschieden und in der zweiten Minute betrug der Anteil der in der Ameisensäure enthaltenen Radioaktivität weniger als 50 % von der insgesamt in dieser Fraktion gefundenen ^{14}C -Menge. Dieser Befund kann mit der Annahme gedeutet werden, daß während der ersten 2 Minuten radioaktiver Formaldehyd in den Harn übertritt, während später, infolge der raschen Oxydation kein freier Form-

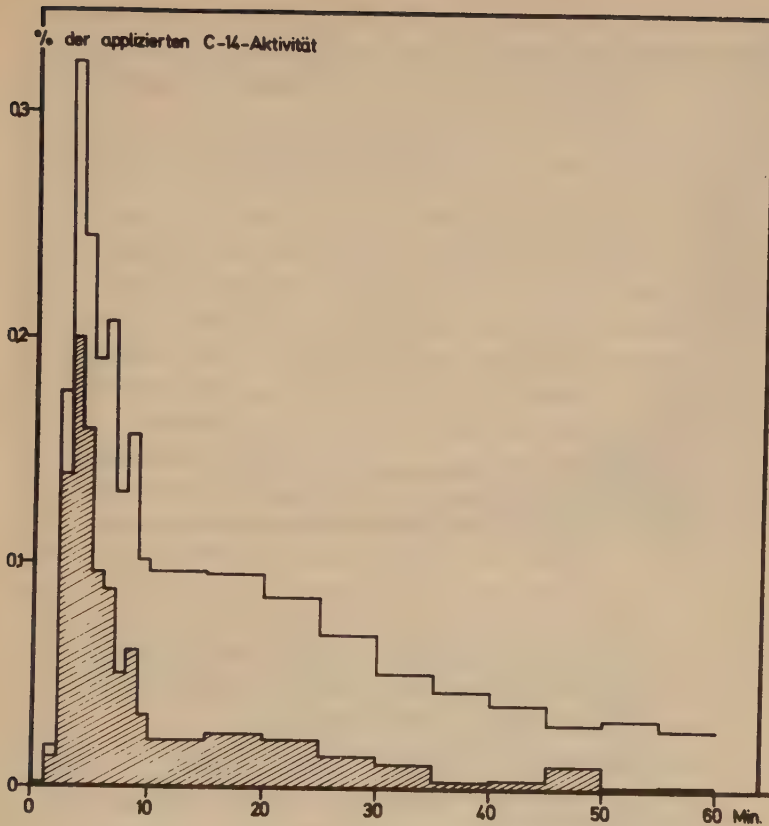


Abb. 7: Harnausscheidung von ^{14}C bei einer Ratte (♀, 140 g) nach intravenöser Injektion von radiomarkierter Ameisensäure.
schraffiertes Areal: als Ameisensäure vorliegender radioaktiver Kohlenstoff in % von der applizierten Dosis.
nicht schraffiertes Areal: insgesamt ausgeschiedener ^{14}C in % von der applizierten Dosis.
Die Ratte erhielt $195 \cdot 10^6$ T.p.m./Tier
= 1,4 mg/kg

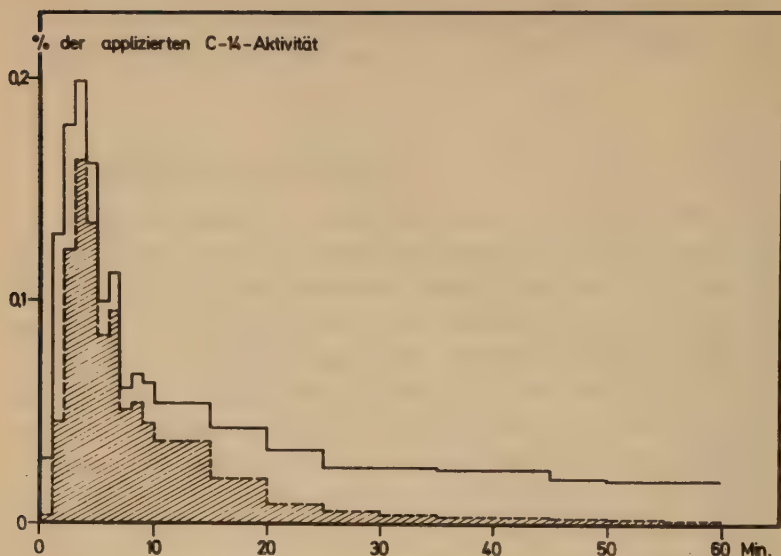


Abb. 8: Harnausscheidung von ^{14}C bei einer Ratte (♀, 146 g) nach intravenöser Injektion von radiomarkiertem Formaldehyd.
schraffiertes Areal: als Ameisensäure vorliegender radioaktiver Kohlenstoff in % von der applizierten Dosis.
nicht schraffiertes Areal: insgesamt ausgeschiedener ^{14}C in % von der applizierten Dosis.
Die Ratte erhielt $113 \cdot 10^6$ T.p.m./Tier
= 0,83 mg/kg

aldehyd mehr im Blut vorhanden ist und deshalb nicht im Harn erscheinen kann. Da es sich nur um sehr kleine Mengen Formaldehyd handelt, ist der experimentelle Nachweis nicht gelungen.

Im weiteren Verlauf des Versuches war stets ein Teil des radioaktiven Kohlenstoffes in Produkten enthalten, die aus

der Ameisensäure entstanden sind. Dieser Anteil wurde mit der Zeit im Verhältnis zu der ausgeschiedenen, markierten Ameisensäure immer größer. In den ersten 10 bis 20 Minuten, in denen sehr viel Radioaktivität in Form von CO_2 abgeatmet wird, mag ein Teil des radioaktiven Kohlenstoffes auch als Bicarbonat im Harn enthalten sein.

Um weitere Informationen darüber zu erhalten, in welchen Verbindungen der radioaktive Kohlenstoff im Harn vorliegt, wurden die einzelnen Fraktionen mit Hilfe der Papierchromatografie aufgetrennt. Bei der Autoradiografie der Papierstreifen zeigte sich, daß sich die Hauptmenge des im Harn vorhandenen ^{14}C auf drei Fraktionen verteilt. Aus den Abbildungen 9 und 10 ist auch hier eine weitgehende Übereinstimmung zwischen dem nach Formaldehydgabe und dem nach Ameisensäureapplikation gewonnenen Harn zu ersehen.

In den ersten Minuten überwiegt bei beiden die Schwärzung, die auf Formiat zurückgeführt werden kann. Bei der zum Vergleich durchgeführten Papierchromatografie mit authentischem Formiat wurde der Film an der gleichen Stelle geschwärzt. Bei den später abgesonderten Harnfraktionen ist das an dieser Stelle liegende radioaktive Produkt nur noch in kleiner Menge vorhanden. Außerdem erscheinen auf dem Chromatogramm des authentischen Formiats dicht unter der Lösungsmittelfront zwei Flecke, die verglichen mit der Hauptmenge relativ wenig Radioaktivität enthalten. Die gleichen Schwärzungen finden sich auch auf den Autoradiogrammen der Papierstreifen, auf denen die ersten Harnfraktionen getrennt wurden, die gleichzeitig eine stärkere Radioaktivität im Bereich des R_f -Wertes der Ameisensäure zeigen. Diese wenig Strahlung abgebenden Komponenten in der Nähe der Lösungsmittelfront finden sich in den später gewonnenen Harnfraktionen, in denen auch nur wenig Ameisensäure enthalten ist, ebenfalls in immer geringeren Mengen. Somit kann angenommen werden, daß sie auf Formiat

Legende zu Abbildung 9 auf Seite 35:

Abb. 9: Harnfraktionen von einer Ratte nach intravenöser Injektion von radiomarkiertem Formaldehyd.

Jeweils links die mit Dimethylaminobenzaldehyd entwickelten Chromatogramme.

Rechts davon die autoradiografische Darstellung der Papierstreifen. Mit D.A.B. färbt sich Allantoin (untere Anfärbung) und Harnstoff (obere Anfärbung) an.

Lösungsmittel: n-Butanol, n-Propanol, Äthanol, Ameisensäure, Wasser im Verhältnis:

6 : 2 : 1 : 1 : 2

I
12.4.60



4-5 8-9 10-15 25-30 40-45

Minuten nach der Applikation



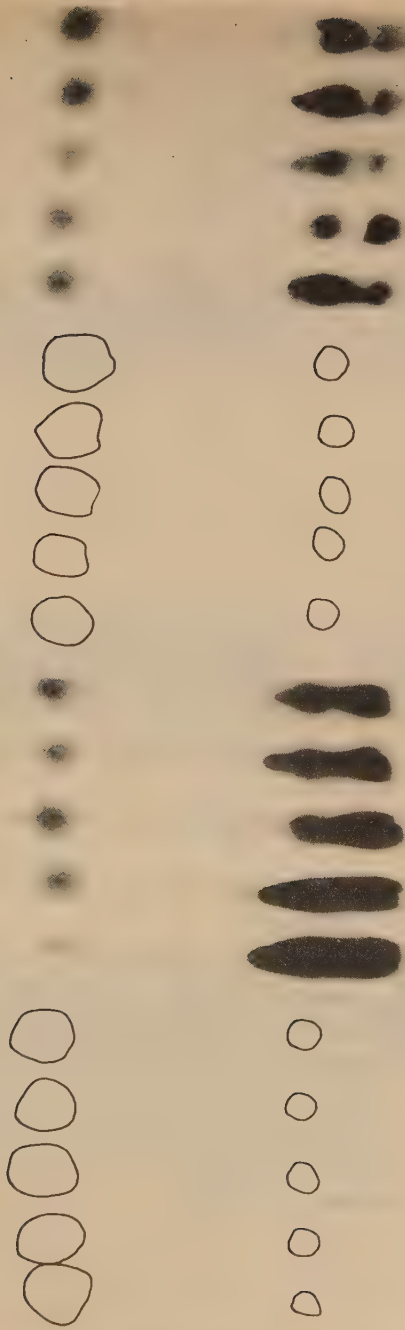
55-60 75-90 105-120 120-150

Minuten nach der Applikation



Legende zu Abbildung 10 auf Seite 37:

Abb. 10: Papierchromatografische Auftrennungen der Harnfraktionen einer Ratte, die intravenös radiomarkierte Ameisensäure erhalten hatte. Links ein Autoradiogramm eines Chromatogramms von ^{14}C -Ameisensäure.
Erläuterungen siehe zu Abb. 9

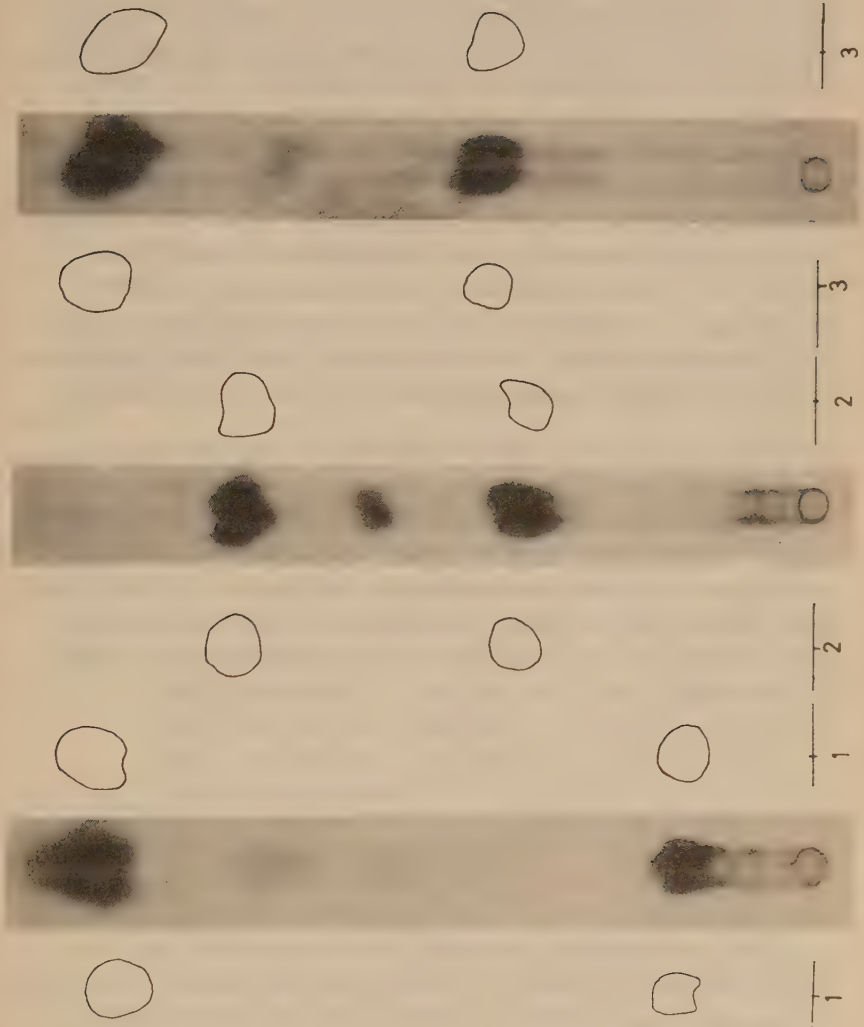


55-60 60-90 105-120 120-150 150-180
Minuten nach der Applikation

4-5 8-9 10-15 25-30 40-45
Minuten nach der Applikation

Legende zu Abbildung 11 auf Seite 39:

- Abb. 11: Papierchromatografie von Harnstoff und Allantoin nach Gabe von ^{14}C -Formaldehyd in drei verschiedenen Lösungsmittelgemischen.
1. n-Propanol, 25 %iger Ammoniak, Wasser/
6 : 1 : 3
 2. n-Propanol und 0,8 molare Ammonacetatlösung/ 4 : 1
 3. n-Butanol, n-Propanol, Äthanol, Ameisensäure, Wasser/ 6 : 2 : 1 : 1 : 2
- links: Harnstoff und Allantoin mit Dimethylaminobenzaldehyd angefärbt.
- Mitte: Autoradiogramme der papierchromatografischen Trennung des Harns.
- rechts: Anfärbung des gleichen Chromatogramms mit D.A.B.



zurückgeführt werden können, das in diesem Lösungsmittelgemisch offenbar nicht als einheitlicher Fleck wandert.

Dicht über der Ameisensäure findet sich die zweite radioaktiv markierte Verbindung, die durch Vergleich der Rf-Werte in drei verschiedenen Lösungsmitteln als Allantoin, dem im Harn erscheinenden Hauptabbauprodukt der Purine, identifiziert werden konnte (Abb.11). Die dritte Verbindung, die ^{14}C enthielt, war Harnstoff. Das geht ebenfalls aus der Gleichheit der Rf-Werte in drei verschiedenen Lösungsmitteln hervor, und außerdem weist die Bildung eines gelben Farbstoffes mit Dimethylaminobenzaldehyd darauf hin. Die Färbung auf dem Chromatogramm und die Schwärzung des Films bei der Autoradiografie haben stets die gleichen Umrisse, was als zusätzlicher Hinweis auf die Identität dieser Verbindung mit Harnstoff zu werten ist.

Daneben sind auf dem Autoradiogramm der Papierstreifen noch einige Areale zu sehen, die eine geringfügige Schwärzung zeigen, deren chemische Natur nicht aufgeklärt werden konnte. Vermutlich wird es sich um Aminosäuren handeln, von denen in erster Linie Arginin und Serin in Frage kommen. Jedoch ist es nicht gelungen, eine der markierten Verbindungen mit diesen Aminosäuren einwandfrei zu identifizieren.

3. ^{14}C -Konzentration im Blut

Die folgenden Experimente befaßten sich mit der Bestimmung von ^{14}C im Blut und wurden ebenfalls mit markierter Ameisensäure und markiertem Formaldehyd vorgenommen. Die halb-logarithmisch dargestellten Kurvenzüge in Abbildung 12 geben

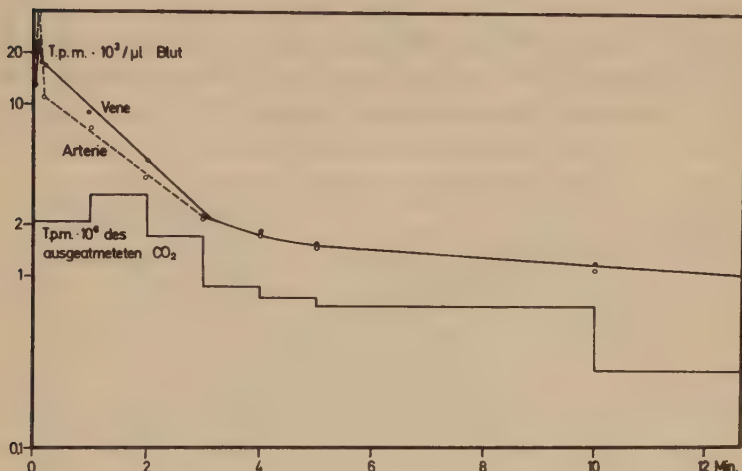


Abb. 12: Radioaktivität im venösen und arteriellen Blut und in dem abgeatmeten $^{14}\text{CO}_2$ einer Ratte nach intravenöser Injektion von ^{14}C -markierter Ameisensäure.

Dosis: $236 \cdot 10^6$ T.p.m. = $238 \mu\text{g}$ /Tier

wieder, mit welcher Geschwindigkeit die Konzentration von ^{14}C im Blut bei einer Ratte nach der intravenösen Applikation von markierter Ameisensäure abnimmt. Die verabfolgte Dosis betrug $236 \cdot 10^6$ T.p.m. in $238 \mu\text{g}$ Ameisensäure. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurde sowohl aus der Vene als auch aus der Arterie in den ersten 10 Sekunden 10 mal, dann bis 5. Minute im Abstand von je einer Minute

und daran anschließend alle 5 Minuten Blut abgenommen. Im venösen und im arteriellen Blut stieg die Konzentration zunächst an, so daß 5 Sekunden nach der Injektion in beiden Gefäßabschnitten ein Maximum entsteht, bei dem die Konzentration im arteriellen Blut $35 \cdot 10^6$ T.p.m./ml beträgt und im venösen Blut mit $24 \cdot 10^6$ T.p.m./ml deutlich darunter liegt. Zu dieser Zeit beträgt das Volumen, indem sich die injizierte Menge verteilt, folglich rund 7 ml. Das ist ungefähr die Hälfte des Blutvolumens der 140 g schweren Ratte. Daraus kann geschlossen werden, daß sich die radioaktive Verbindung zunächst nur im Blutplasma befindet. Die Ameisensäure tritt anschließend relativ rasch auch in die extravasalen Räume und ins Innere der Zellen ein. Für kurze Zeit, d.h. für die Spanne von 5 bis 10 Sekunden, muß das Abströmen aus dem arteriellen Blut in die extravasalen Räume der Vorgang sein, der stärker zur Verminderung der ^{14}C -Konzentration des Blutes beiträgt. Anders ist die arterio-venöse Differenz nicht zu erklären. In der darauffolgenden Zeitspanne zwischen 10 Sekunden und etwa 3 Minuten findet sich im venösen Blut mehr radioaktiver Kohlenstoff als im arteriellen. Danach wird die Kurve ständig flacher und die Werte im venösen und im arteriellen Blut unterscheiden sich nicht mehr. In den ersten 3 Minuten, so wird man schließen müssen, wird die Erniedrigung der Konzentration durch zwei Vorgänge bewirkt, erstens durch das Abströmen der den radioaktiven Kohlenstoff enthaltenden Verbindung in die Gewebe und zweitens durch die Ausscheidung von ^{14}C -haltigem CO_2 , der durch Oxydation der Ameisensäure entstanden ist. Offenbar wird mehr ^{14}C abgeatmet als in die extravasalen Räume übertritt, denn die Konzentration im venösen Blut ist höher als im arteriellen. Mit dieser Deutung steht im Einklang, daß das Maximum der Elimination durch die Ausatmung von CO_2 in dieser Zeitspanne liegt. Extrapoliert man aus den Werten, die den flacheren Abfall der Kurve in der Zeit nach der 3. Minute ergeben, auf den Zeitpunkt 0,

so läßt sich errechnen, daß die applizierte Dosis sich in einem Flüssigkeitsraum verteilt hat, der etwa $\frac{2}{3}$ des Körpergewichtes ausmacht. Das heißt, der Verteilungsraum erstreckt sich nun auf das gesamte Flüssigkeitsvolumen des Organismus, einschließlich der Intrazelluläräume. Jedoch verläuft die Kurve in der Zeit nach der 25. Minute parallel zur Zeitachse des Koordinatensystems. Schon das deutet auf eine Bindung an langlebige Blutbestandteile hin. Die Berechnung des Verteilungsvolumens ergibt nun einen Wert, der größer wäre als das gesamte Körpervolumen, so daß auf eine Anreicherung an bestimmten Stellen geschlossen werden kann.

Zusätzlich wurde in den einzelnen Blutproben die Konzentration der Ameisensäure bestimmt. Die Kurven, die sich aus der logarithmischen Auftragung der Werte gegen die Zeit nach der Applikation ergeben, sind in Abbildung 13 dargestellt. Hier ist außerdem die Abgabe von CO_2 mit der ausgeatmeten Luft und die Ausscheidung von ^{14}C mit dem Harn, die bei einem anderen Tier ermittelt wurden, eingezeichnet. Die Ameisensäurekonzentration vermindert sich exponentiell, d.h. in dem gewählten Koordinatensystem liegen die Punkte auf einer geraden Linie. Somit läßt sich die Halbwertszeit der Ameisensäure ablesen, die ca. 5 $\frac{1}{2}$ Minuten beträgt.

Im Anschluß an dieses Experiment mit markierter Ameisensäure wurde die gleiche Untersuchung mit markiertem Formaldehyd durchgeführt. Die applizierte Radioaktivität war jedoch nur halb so hoch und betrug $118 \cdot 10^6$ T.p.m. In Abbildung 14 sind die ermittelten Werte grafisch dargestellt. Grundsätzlich verläuft die Elimination mit der Ausatemungsluft und über die Niere so wie bei der Ameisensäure. Auch die Abnahme der ^{14}C -Konzentration des Blutes erfolgt mit etwa der gleichen Geschwindigkeit, wenn man die möglichen Schwankungen von Tier zu Tier berücksichtigt. Auch hier ist nach der 30. Minute keine weitere

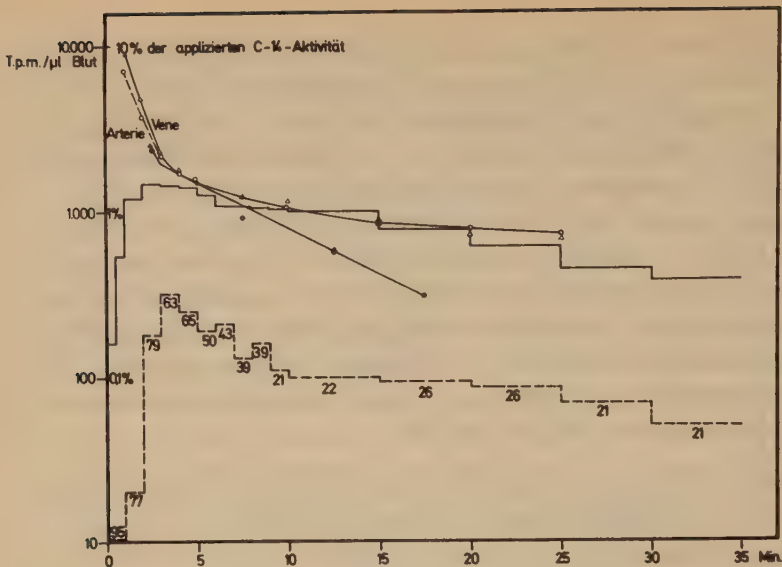


Abb. 13: Elimination von ^{14}C -markierter intravenös zugeführter Ameisensäure bei Ratten. Zeitabhängige Änderung der Konzentration der gesamten Radioaktivität und der radiomarkierten Ameisensäure im arteriellen und im venösen Blut. Ausscheidung mit dem Harn und durch die Lunge.

- T.p.m./μl arterielles Blut
- △ T.p.m./μl venöses Blut
- T.p.m. in der Ameisensäure/μl arterielles Blut
- ▲ T.p.m. in der Ameisensäure/μl venöses Blut

durchgezogene Balken: als CO_2 abgeatmet $^{14}\text{C}/\text{Min.}$ in % von der applizierten Menge.
gestrichelte Balken: mit dem Harn ausgeschiedener ^{14}C in % von der applizierten Menge. Die Zahlen geben in % den Anteil an, der als Ameisensäure vorliegt.

Werte im Blut von einem Tier das $236 \cdot 10^6$ T.p.m. erhalten hatte. Werte von Harn und Ausatemluft von einem anderen Tier, das $195 \cdot 10^6$ T.p.m. erhalten hatte.

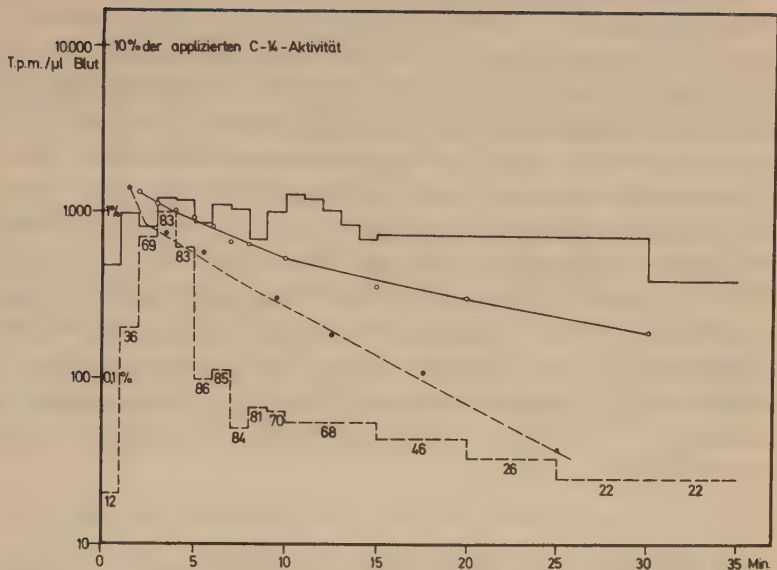


Abb. 14: Elimination von ^{14}C -markiertem, intravenös zugeführtem Formaldehyd bei Ratten. Zeitabhängige Änderung der Konzentrationen der gesamten Radioaktivität und der radiomarkierten Ameisensäure im arteriellen Blut. Ausscheidung mit dem Harn und durch die Lunge.

○ T.p.m./μl arterielles Blut

● T.p.m. Ameisensäure/μl arterielles Blut
durchgezogene Balken: als CO_2 abgeatmeter $^{14}\text{C}/\text{Min.}$ in % von der applizierten Menge.

gestrichelte Balken: mit dem Harn ausgeschiedener $^{14}\text{C}/\text{Min.}$ in % von der applizierten Menge. Die Zahlen geben in % den Anteil an, der als Ameisensäure vorliegt.

Werte im Blut und in der Ausatemungsluft von einem Tier, das $118 \cdot 10^6$ T.p.m. erhalten hatte.

Werte vom Harn von einem Tier, das $113 \cdot 10^6$ T.p.m. erhalten hatte.

Verminderung der Konzentration mehr festzustellen. Die Bestimmung der ^{14}C -Konzentration, die als Ameisensäure im Blut vorhanden war, ergab im halblogarithmischen System ebenfalls einen gradlinigen Verlauf. In Abbildung 15 sind die Kurvenzüge, die sich aus den Bestimmungen der ^{14}C -Konzentrationen im Blut zu verschiedenen Zeiten nach der Applikation von markierter Ameisensäure und markiertem Formaldehyd ergaben, zum besseren Vergleich noch einmal zusammen aufgetragen. Aus dem Formaldehyd ist, wie man daraus entnehmen kann, relativ rasch Ameisensäure entstanden. Offenbar ist nur ein geringer Anteil nicht oxydiert worden, und dadurch ist die Differenz zwischen der gesamten ^{14}C -Konzentration und der als Ameisensäure vorhandenen ^{14}C -Menge nach der Gabe des ^{14}C als Formaldehyd zu erklären.

4. Oxydation von Formaldehyd zu Ameisensäure in vitro

Das Ergebnis des vorhergehenden Versuches gab Veranlassung, zu prüfen, ob Formaldehyd im Blut auch in vitro zu Ameisensäure oxydiert werden kann. Aus diesem Grunde wurde markierter Formaldehyd dem Blut von Ratte, Hund und Mensch zugesetzt und nach Ablauf von 2, 5 und 10 Minuten analysiert, welcher Anteil in Ameisensäure umgewandelt worden war. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3 zusammengestellt.

Schon nach 2 Minuten ist bei der Inkubation mit Blut der Formaldehyd zur Ameisensäure oxydiert worden. Nur bei menschlichem Blut verläuft dieser Vorgang etwas langsamer, denn nach 2 Minuten fanden sich nur 82 % des ^{14}C in der Ameisensäure, aber auch hier war nach 5 Minuten bereits der gesamte Formaldehyd oxydiert. Eine weitere Umsetzung der Ameisensäure hat offenbar nur im Hundeblut stattgefunden, denn dort ist der in der Ameisensäure gefundene Anteil nach 5 Minuten auf 85 % und nach 10 Minuten auf 70 %

Tabelle 3: % des als Formaldehyd eingesetzten ^{14}C als Ameisensäure gefunden:

Inkubation Minuten	menschl. Blut	menschl. Plasma	Hunde- blut	Hunde- plasma	Ratten- blut	Ratten- plasma
2	82	0,4	114	0,1	109	5,6
5	100	1,6	85	0	113	1,9
10	97	4,9	70	0,6	-	0

Oxydation von Formaldehyd zu Ameisensäure in vitro:
0,5 ml Blut oder Plasma wurden mit $567 \cdot 10^3$ T.p.m. ^{14}C
als Formaldehyd inkubiert. Zur Isolierung der Ameisensäure
und Bestimmung der darin enthaltenen Radioaktivität wurden
jeweils 100 bzw. 50 μl entnommen.

abgesunken. Nach Abzentrifugieren der Erythrozyten war so
gut wie keine Oxydation festzustellen. Die geringfügigen
Anteile des eingesetzten radioaktiven Kohlenstoffes, die
sich nach der Inkubation mit Plasma in der Ameisensäure
finden ließen, sind wohl durch nicht genügend sauber abge-
trennten Formaldehyd bedingt. Für die Oxydation von Form-
aldehyd sind also die Blutzellen verantwortlich, höchst-
wahrscheinlich die Erythrozyten. Dagegen findet im Blut
in dieser kurzen Zeit keine, oder höchstens im Hundeblut
eine geringfügige Oxydation von Ameisensäure zu CO_2
statt.

Aufgrund der in vivo- und in vitro-Versuche erscheint der
Schluß gerechtfertigt, daß der weitaus größte Teil des
Formaldehyds, sobald er ins Blut gelangt, innerhalb von
ca. 2 Minuten zu Ameisensäure oxydiert wird.

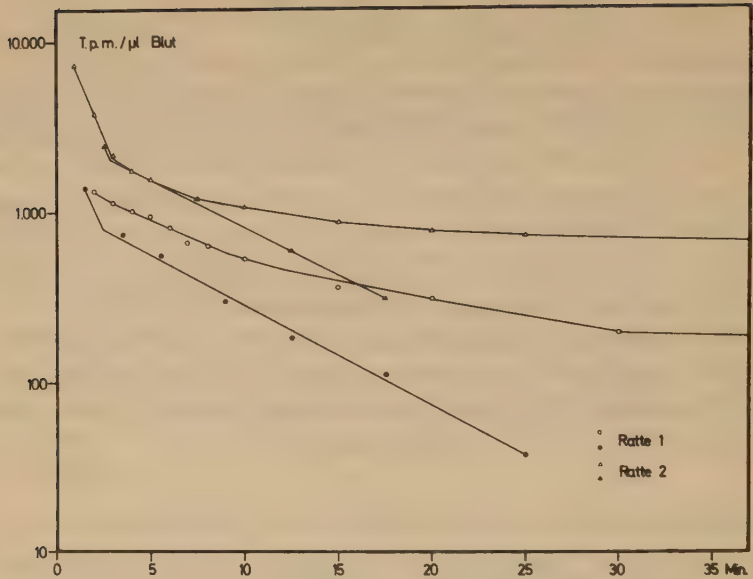


Abb. 15: Vergleich des Kurvenverlaufes der Radioaktivität und der ^{14}C -Ameisensäure im Blut nach intra-venöser Injektion von radiomarkiertem Formaldehyd und radiomarkierter Ameisensäure im Blut von Ratten.

Ratte 1 erhielt $118 \cdot 10^6$ T.p.m. radiomarkierten Formaldehyd

○ T.p.m./ul arterielles Blut

● T.p.m. Ameisensäure/ul arterielles Blut

Ratte 2 erhielt $236 \cdot 10^6$ T.p.m. radiomarkierte Ameisensäure

△ T.p.m./ul arterielles Blut

▲ T.p.m. Ameisensäure/ul arterielles Blut

5. Verteilung der im Blut vorhandenen ^{14}C -haltigen Bestandteile zwischen Plasma und Zellen

Um festzustellen, ob die radioaktiv markierten Stoffe des Blutes eine feste Bindung mit den Plasma-Eiweiß-Körpern eingehen oder in die zelligen Bestandteile eingebaut sind, wurde der Quotient zwischen den Konzentrationen im Plasma und in den Zellen ermittelt. Er hatte, wie die Tabelle 4 zeigt, nach der Applikation von Formaldehyd sowohl kurz

Tabelle 4: Verteilung der Radioaktivität zwischen Plasma und den Zellen des Blutes bei einer Ratte nach intravenöser Injektion von ^{14}C -markiertem Formaldehyd in T.p.m./ul

Minuten nach d.Applikation	Plasma	Zellen	$\frac{\text{Plasma}}{\text{Zellen}}$
2,5	1650	1092	1,51
6,5	856	566	1,51
33,5	266	149	1,78

Verteilung der Radioaktivität zwischen Plasma und den Zellen des Blutes einer Ratte nach intravenöser Injektion von ^{14}C -markierter Ameisensäure in T.p.m./ul

Minuten nach d.Applikation	Plasma	Zellen	$\frac{\text{Plasma}}{\text{Zellen}}$
3,5	2850	1320	2,16
8,5	1570	760	2,07
13,5	1170	570	2,05
18,5	1040	480	2,17
23,5	940	470	2,00

nach der Gabe als auch eine halbe Stunde später den Wert von ca. 1,5. Bei dem Tier, das Ameisensäure erhalten hatte, war der Quotient etwas größer, lag aber während der gesamten Versuchszeit einheitlich um den

Wert 2. Daraus geht hervor, daß in beiden Versuchen Stoffe vorhanden waren, deren Verteilung zwischen Plasma und Erythrozyten stets konstant ist. Da im Plasma mehr vorhanden war als in den Erythrozyten, muß es sich zum Teil um Stoffe handeln, die die Zellmembran nicht frei permeieren können oder locker an Plasmaproteine adsorbiert sind. Bei der Prüfung des Verteilungsgleichgewichtes der Ameisensäure ergaben sich keine Unterschiede zwischen der Konzentration im Blut und in den Erythrozyten. In der Abbildung 16 sind die Konzentrationen der Ameisensäure im Blut in Abhängigkeit von der Zeit halblogarithmisch aufgetragen und

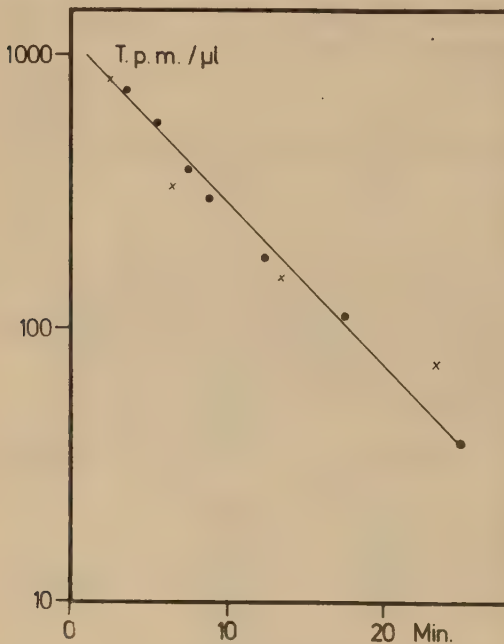


Abb. 16: Konzentration der Ameisensäure im Blut und in den Erythrozyten einer Ratte nach intravenöser Injektion von $118 \cdot 10^6$ T.p.m. ^{14}C -Formaldehyd.

● T.p.m. Ameisensäure/µl Blut

x T.p.m. Ameisensäure/µl Erythrozyten

gleichzeitig die in den Erythrozyten ermittelten Werte dargestellt. Da die Konzentration in den Erythrozyten zu jedem Zeitpunkt genau so groß ist wie die des Blutes muß eine gleichmäßige Verteilung zwischen Plasma und Erythrozyten vorliegen.

II. Bilanz- und Verteilungsstudien an Mäusen nach oraler Applikation von radiomarkiertem Hexamin

1. Ausscheidung als CO₂

In den nächsten Experimenten wurde bei Mäusen die Elimination von ¹⁴C-Hexamin nach oraler Applikation studiert.

Der erste Versuch diente der Ermittlung des Anteils, der nach Spaltung von Hexamin im Magen-Darm-Trakt oder im Blute als CO₂ abgeatmet wird. Dazu erhielt eine Maus Hexamin, das aus radioaktiv markiertem Formaldehyd hergestellt worden war, so daß der bei der Hydrolyse entstehende Formaldehyd wieder an der radioaktiven Strahlung erkannt werden konnte. In der Ausatemungsluft fand sich nur ein sehr geringer Anteil, der innerhalb von 5 Stunden etwa 2 % des applizierten Kohlenstoffes ausmacht. Der größte Teil des Kohlenstoffes, der auf diese Weise ausgeschieden wird, ist in der Fraktion von der ersten halben Stunde enthalten. Danach wird nur noch sehr wenig markierte CO₂ abgeatmet (Tabelle 5). Daraus ist abzuleiten, daß etwa 10 % des Hexamins im Magen-Darm-Trakt gespalten und als Formaldehyd resorbiert wird.

In der Ausatemungsluft konnte nach oraler Applikation von 5 g Hexamin/kg kein Formaldehyd gefunden werden, so daß die in der Ausatemungsluft vorhandene Radioaktivität allein als CO₂ vorlag.

Tabelle 5: Ausscheidung von $^{14}\text{CO}_2$ bei einer Maus nach oraler Applikation von $55,2 \cdot 10^6$ T.p.m.
 ^{14}C -Hexamin/Tier = 84 mg/kg

Minuten nach d.Applikation	% der applizierten Dosis ausgeschieden als CO_2
0- 30	0,85
30- 60	0,43
60- 90	0,19
90-120	0,15
120-150	0,12
150-180	0,06
180-210	0,05
210-240	0,04
240-270	0,03
270-300	0,03
insgesamt:	1,95 %

2. Elimination mit dem Harn

Mit dem Harn werden im Laufe von 22 Stunden 77,5 % des als Hexamin zugeführten radioaktiven Kohlenstoffes ausgeschieden. Die Ausscheidung über die Niere setzt, wie das Diagramm in Abbildung 17 zeigt, schon in den ersten Minuten nach der Zufuhr ein, und der größte Teil hat innerhalb von 3 - 4 Stunden auf diesem Weg den Organismus verlassen. Die Darstellung erweckt den Anschein, als wäre in der zweiten Stunde ein Minimum der Ausscheidung vorhanden. Unter Heranziehung der Konzentrationen des Harns an radioaktivem Kohlenstoff, die aus Abbildung 18 und 19 hervorgehen, ergibt sich jedoch, daß dieses Minimum durch eine Verminderung des ausgeschiedenen Volumens bedingt ist.

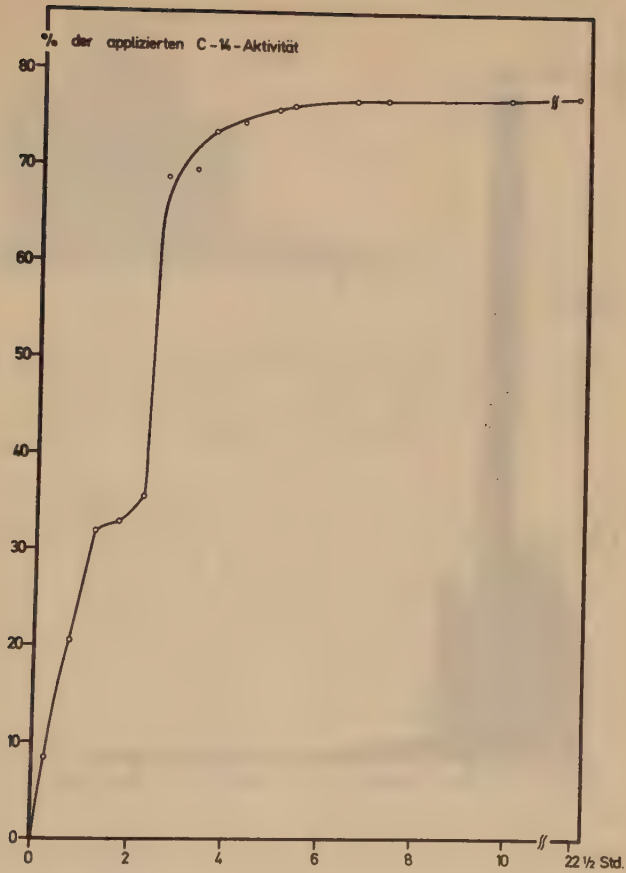


Abb. 17: ^{14}C -Ausscheidung bei einer Maus (24 g, ♂) mit dem Harn nach oraler Applikation von $55,2 \cdot 10^6$ T.p.m. ^{14}C -Hexamin/Tier = 84 mg/kg.

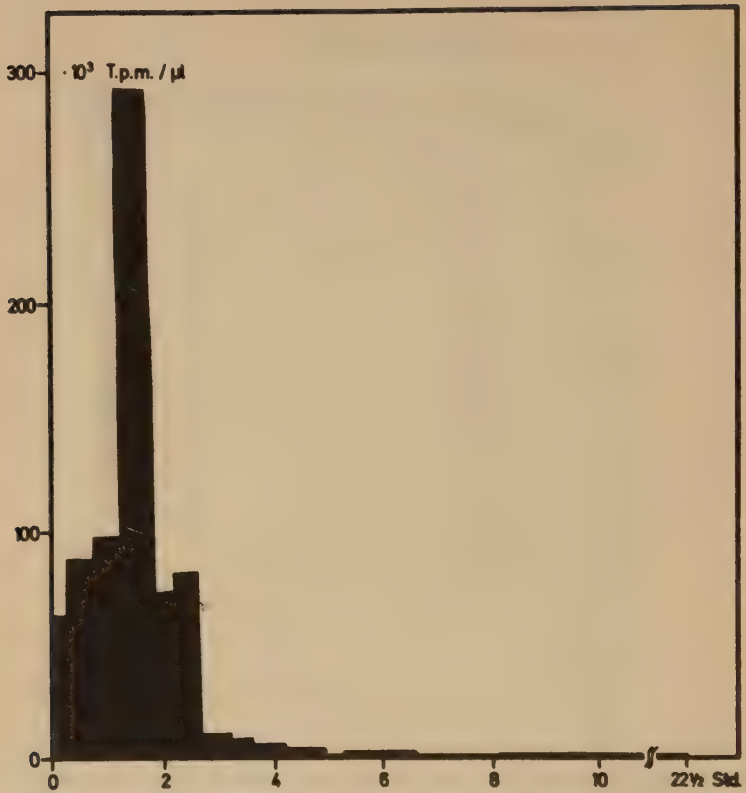


Abb. 18: Ausscheidung von ^{14}C in T.p.m./ μl von jeder Harnfraktion nach oraler Applikation von $55,2 \cdot 10^6$ T.p.m. ^{14}C -Hexamin

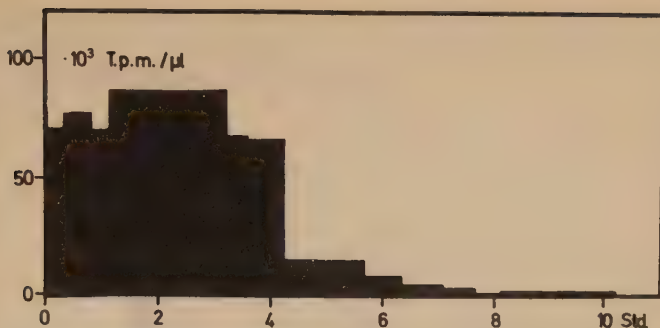


Abb. 19: Ausscheidung von ^{14}C in T.p.m./ μl von jeder Harnfraktion nach oraler Applikation von $46,1 \cdot 10^6$ T.p.m. ^{14}C -Hexamin

Die Ausscheidung erfolgt sehr rasch und spiegelt offenbar die Geschwindigkeit der Aufnahme aus dem Darm wider. Der größte Teil, nämlich 37 % der verabfolgten Menge läßt sich im Harn als Hexamin identifizieren. Ca. 9 % liegen als Formaldehyd vor, der mit größter Wahrscheinlichkeit erst durch Hydrolyse von Hexamin in den ableitenden Harnwegen entstanden sein kann. Wäre die Hydrolyse nämlich bereits im Blut eingetreten, dann wäre der Formaldehyd, wie wir aus den vorangehend geschilderten Untersuchungen wissen, zu Ameisensäure und weiter zu CO_2 oxydiert worden. Es hätte also ein entsprechender Anteil über die Atmung ausgeschieden werden müssen. Somit können die als Hexamin und als Formaldehyd im Harn vorliegenden Anteile addiert werden. Die Summe gibt den Anteil wieder, der tatsächlich als Hexamin aus dem Blut in den Harn übergetreten ist. Rund 21 % des zugeführten Kohlenstoffes sind bei der Bestimmung von Hexamin und Formaldehyd im Widmarkkolben als nicht flüchtige Bestandteile im Löffel zurückgeblieben. In Abbildung 20 ist der in jeder Harnfraktion vorliegende ^{14}C -Anteil von Formaldehyd, Hexamin, festen und flüchtigen Bestandteilen in Prozent von der applizierten Dosis grafisch dargestellt.

Abb. 20: Verteilung der Radioaktivität auf Formaldehyd, Hexamin, feste Substanzen und flüchtige, nicht als Formaldehyd vorliegende Verbindungen in den Harnfraktionen in % von der applizierten Dosis.

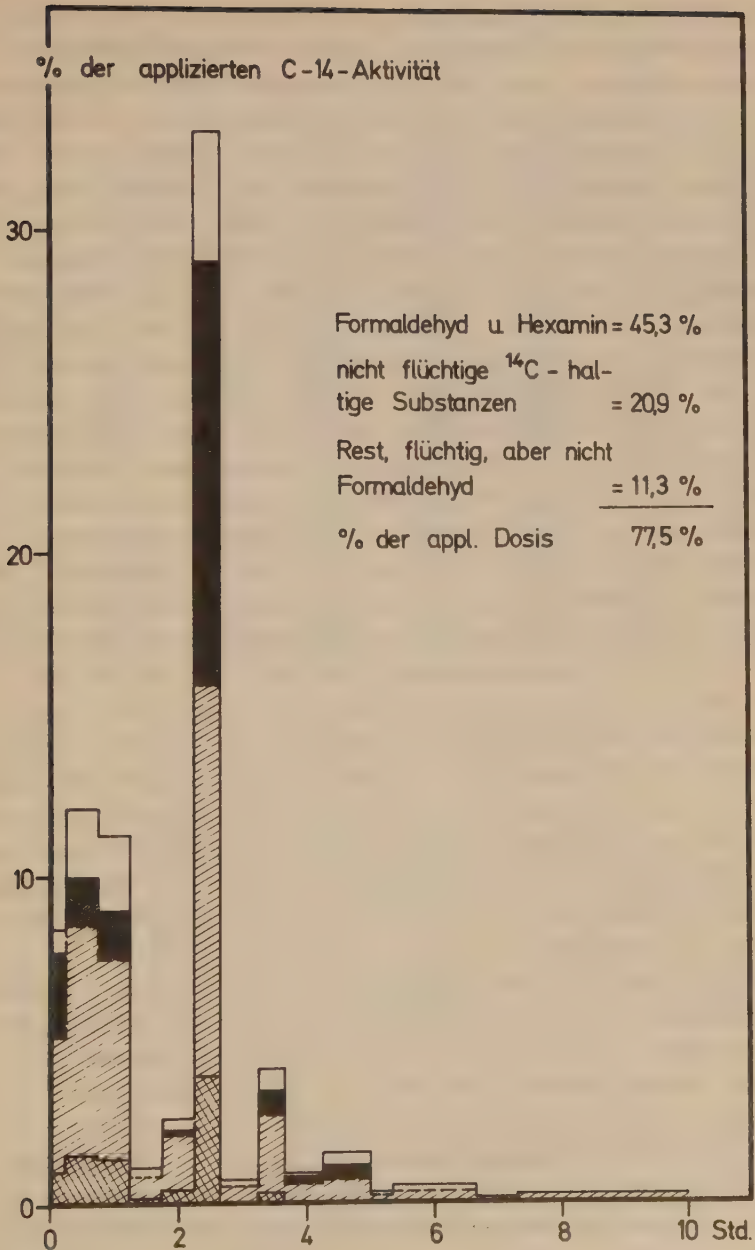
doppelt schraffierte Areale: Formaldehyd

schraffierte Areale: Hexamin

schwarze Areale: feste Substanzen

weiße Areale: flüchtige Substanzen

Dosis: $55,2 \cdot 10^6$ T.p.m. ^{14}C -Hexamin/Tier



Bisher ist es nicht gelungen, festzustellen, in welchen Verbindungen der Kohlenstoff dabei vorliegt. Aus der Autoradiografie nach papierchromatografischer Auftrennung der Harnbestandteile läßt sich kein Hinweis auf derartige Stoffe entnehmen. Somit muß angenommen werden, daß es sich um Formaldehyd handelt, der während der Analysen durch seine Freisetzung aus dem Hexamin mit bestimmten anderen Harnbestandteilen eine relativ feste chemische Bindung eingegangen ist. Dafür käme in erster Linie der Harnstoff in Frage, der in großen Mengen vorliegt und relativ leicht formyliert werden kann. Auf jeden Fall handelt es sich dabei um ein Produkt, das erst während der Analyse entstanden ist und höchstwahrscheinlich noch zu dem als Hexamin ausgeschiedenen Anteil hinzu gezählt werden muß. Folglich bleiben noch etwa 11 % des radioaktiv markierten Kohlenstoffes übrig, die nicht als Hexamin in den Harn übergetreten sind. Dieser Anteil erwies sich jedoch als einer flüchtigen Verbindung zugehörig, die aber nicht Formaldehyd darstellen kann, denn sie reagierte nicht mit Chromotropsäure. Sollte es sich dabei um Ameisensäure handeln, dann könnte sie ebenfalls nur in den ableitenden Harnwegen aus Formaldehyd entstanden sein, denn sonst, wenn die Ameisensäure nämlich aus dem Blut kommen würde, müßte etwa 9 - 10 mal mehr als CO_2 in der Ausatemungsluft vorliegen, als tatsächlich gefunden wurde. Andererseits wäre es durchaus möglich, daß die die Harnwege auskleidenden Epithelien oder im Harn vorhandene Mikroorganismen imstande sind, Formaldehyd zu Ameisensäure zu oxydieren.

Nach der papierchromatografischen Auftrennung der Harnbestandteile fand sich die Radioaktivität ganz überwiegend im Hexamin. In keiner Harnportion sind ins Gewicht fallende Mengen anderer radioaktiver Stoffe aufgefunden worden (Abb. 21).

Von den kleinen Mengen anderer Stoffe, die an der Schwärzung des Filmes zu erkennen sind, könnte ein Fleck Harnstoff sein, denn an der gleichen Stelle, wo Harnstoff zu er-

warten ist, tritt mit Dimethylaminobenzaldehyd eine Gelbfärbung auf.

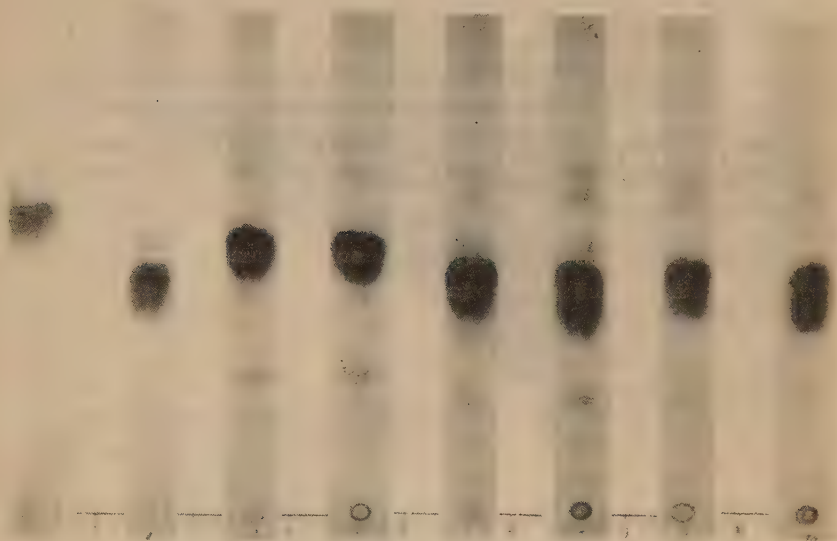


Abb. 21: Autoradiografie und Chromatografie der Harnfraktionen nach oraler Applikation von ^{14}C -Hexamin.

Links ein Autoradiogramm von reinem ^{14}C -Hexamin. Jeweils links von dem Autoradiogramm das entsprechende Chromatogramm der Harnfraktion, auf dem der mit D.A.B. angefärbte Harnstoff abgebildet ist.

Lösungsmittel: n-Butanol, n-Propanol, Äthanol, Ameisensäure, Wasser/ 6 : 2 : 1 : 1 : 2.

3. Verteilung des radioaktiven Kohlenstoffes im Tierkörper

Durch die Messung der radioaktiven Ausscheidungen im Harn und in der Ausatemluft konnten rund 80 % der verabfolgten Menge erfaßt werden. Deshalb war zu untersuchen, wieviel ^{14}C nach Ablauf der 22-stündigen Beobachtungsperiode

noch im Tierkörper verblieben war. 2,5 % fanden sich im Darminhalt und im Kot und 4 % in den Organen und Geweben. Die Konzentrationen in den einzelnen Organen sind in Abbildung 22 grafisch dargestellt.

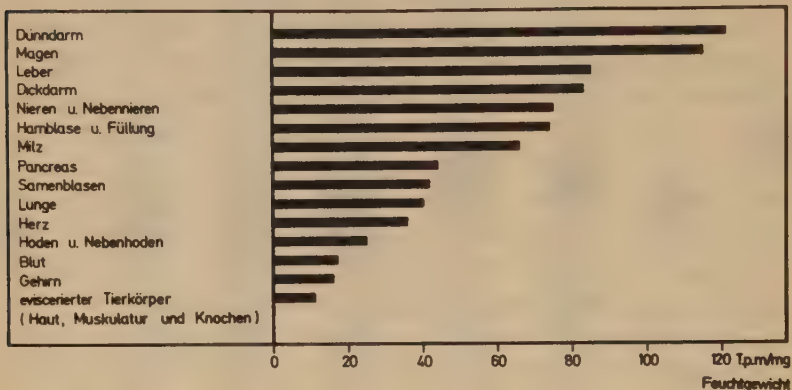


Abb. 22: Aktivität in den Organen und im eviscerierten Tierkörper einer Maus 22 Stunden nach oraler Applikation von 84 mg/ ^{14}C -Hexamin/kg.

Durch Zufall hat das Tier 10 Stunden nach der Applikation Ejakulat entleert, der als derb-elastischer Pfropf aus der Harnröhrenmündung entnommen werden konnte. Zu diesem Zeitpunkt werden im Harn nur noch Spuren von Radioaktivität ausgeschieden. Die Messung der Konzentration im Ejakulat dagegen ergab einen außerordentlich hohen Gehalt von 1900 T.p.m./mg. Das steht in Übereinstimmung mit der starken Markierung der Samenkanälchen bei den nachfolgend geschilderten autoradiografischen Untersuchungen.

In welcher Form der Kohlenstoff vorliegt, hat sich bisher nicht ergründen lassen. Wir müssen jedoch annehmen, daß dieser relativ kleine Anteil chemisch gebunden ist. Da keine Hinweise darauf vorliegen, daß das Hexamin selbst

chemische Reaktionen mit Körperbestandteilen eingehen kann, ist zu vermuten, daß im Gewebe in gewissem Umfange eine Spaltung erfolgte und der Formaldehyd an die Zelleiweiße angelagert worden ist.

Die Bilanz, die aus dem Diagramm in Abbildung 23 zu ersehen ist, weist einen Fehlbetrag von 14 % auf, der analytisch nicht wiedergefunden wurde. Über die Ursache dieser Differenz können nur Vermutungen angestellt werden. Ein Teil könnte über den Speichel und über die Haut ausgeschieden worden sein. Im wesentlichen muß der Fehlbetrag jedoch auf Verluste bei den Analysen zurückgeführt werden.

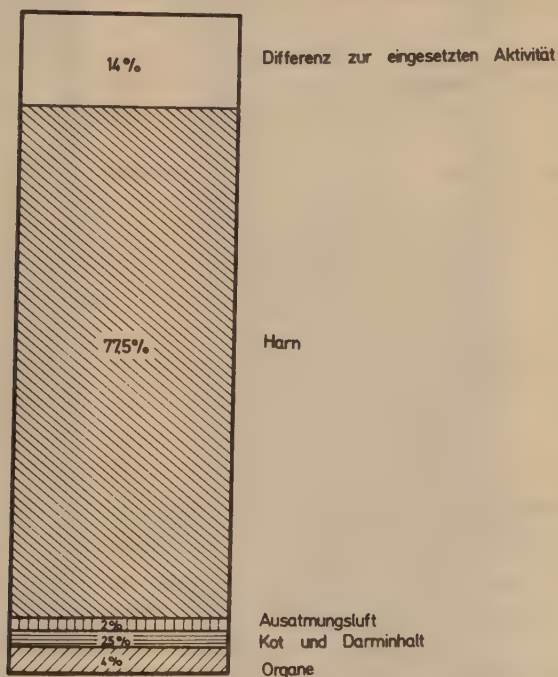


Abb. 23: Verteilung von ^{14}C bei einer Maus, 22 Stunden nach oraler Applikation von 84 mg ^{14}C -Hexamin/kg.

4. Beschreibung der Autoradiogramme von Ganztierschnitten

Autoradiografische Untersuchungen an Ganztierschnitten waren geeignet, ein Bild über die Verteilung des radioaktiven Kohlenstoffes zu verschiedenen Zeiten nach der oralen Verabfolgung zu vermitteln. Tiere, die markiertes Hexamin bekommen hatten, wurden nach 10 Minuten, nach 1 1/2 Stunden, nach 3 Stunden und nach 4 Stunden getötet und die aus ihnen angefertigten Längsschnitte zur Autoradiografie verwendet. Das Gewicht der Tiere und die Dosierungen sind in der Tabelle 6 aufgeführt. Das höhere Gewicht der 4. Maus ist durch die Trächtigkeit dieses Tieres bedingt.

Geschlecht	Gewicht in g	appl. Radio- aktivität pro Tier in Tpm · 10 ⁶	mg ¹⁴ C- Hexamin/ kg	getötet nach
♂	17,5	52,76	108	10 Min.
♂	18,5	52,76	102	1 1/2 Std.
♂	18,5	52,76	102	3 Std.
♀ +	44	46,6	38	4 Std.

Tabelle 6

In den beiden ersten Bildern (Abb. 24 und Abb. 25) sind zwei Autoradiogramme desselben Schnittes der Maus dargestellt, die 10 Minuten nach der Applikation getötet wurde. Die erste Exposition fand unmittelbar nach der Herstellung der Schnitte statt, die zweite 18 Monate später.

Das auffallendste Merkmal ist auf beiden Schnitten, daß der allergrößte Teil des radioaktiven Kohlenstoffes sich noch im Bauchraum, d.h. im oberen Abschnitt des Intestinaltraktes befindet. Daneben ist ein kleines, aber ebenfalls

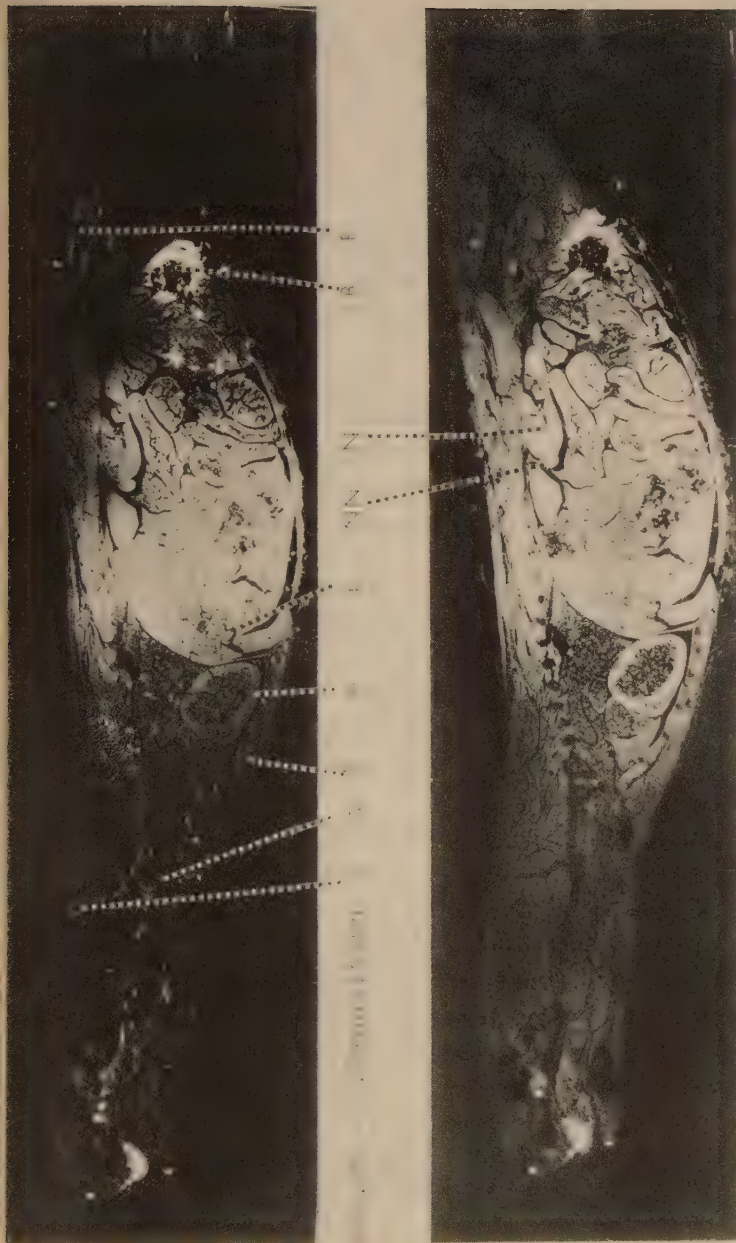


Abb. 24 u. 25: Autoradiogramme eines Ganztierschnittes, Maus, 17,5 g, getötet
10 Min. nach oraler Applikation von $52,76 \cdot 10^6$ T.p.m. ± 108 mg
 ^{14}C -Hexamin/kg.

S = Schädelkapsel
W = Wirbelknochen
R = Rippe

H = Herz
L = Leber
NN = Nebenniere

N = Niere
B = Harnblase
F = Femur

Die Aufhellung auf der Fotografie entspricht einer Schwärzung
auf dem Film.

noch deutlich hervortretendes Areal zu sehen, in dessen Mittelpunkt die Blase liegt. Im übrigen Tierkörper findet sich nur spärlich radioaktiver Kohlenstoff. Deutlich tritt aber die Markierung der Corticalis der Knochen hervor. Das sieht man an dem längs geschnittenen Femur, an den Rippen, an den oberen Wirbelkörpern und an der Schädelkapsel. Etwas Radioaktivität erscheint auch im Herzmuskel. Dort ist ebenfalls die hervorgerufene Schwärzung intensiver als in dem das Herzlumen ausfüllenden Blut. Auffallend erscheint außerdem eine intensive Schwärzung über dem Mark der Nebenniere.

Bei der nach 18 Monaten erneut vorgenommenen Exposition war die Radioaktivität aus den Knochen weitgehend verschwunden. Daraus muß geschlossen werden, daß es sich um flüchtige Verbindungen handelte, die im Laufe der Zeit abdiffundiert sind und sich möglicherweise an anderen Stellen wieder angelagert haben.

Auf das Vorhandensein des markierten Kohlenstoffes in einer flüchtigen Verbindung weist auch die Unschärfe des ersten Autoradiogrammes von dem nächsten Schnitt hin, der von einem Tier stammt, das 1 1/2 Stunden nach der Gabe getötet wurde (Abb. 26 u. 27). Die gleiche Erscheinung fand sich bei den Autoradiogrammen der Schnitte in den beiden später getöteten Tieren.

Nach 1 1/2 Stunden war in den Baueingeweiden immer noch die meiste Radioaktivität enthalten. Jedoch kann man nun schon die einzelnen Teile viel besser differenzieren. Stark geschwärzt und in die Umgebung ausstrahlend ist gegen das Schwanzende des Tieres im Bauchraum die Blase zu erkennen. Diffus und stark markiert sind die Niere und die Leber. Zufällig hatte dieses Tier einen Leberabszess, der sich durch geringeren Gehalt an ^{14}C deutlich abhebt. Bei diesem Tier markiert sich die Corticalis der Knochen nur an einigen Stellen, z.B. an den Querschnitten der Rippen. Am Femur sieht man nur eine dünn markierte Umgrenzungs-



Abb. 26 1. Exposition



Abb. 27 2. Exposition

Abb. 26 u. 27: Autoradiogramme eines Ganztierschnittes, Maus, 18,5 g, getötet
 1 1/2 Std. nach oraler Applikation von $52,76 \cdot 10^6$ T.p.m. Δ 102 mg
 ^{14}C Hexamin/kg.

- | | |
|----------------------------|-------------|
| MS = Mundschleimhaut | A = Abszess |
| G = Gehirn | N = Niere |
| Z = Zwischenwirbelscheiben | H = Hoden |
| FK = Fettkörper | F = Femur |

Schicht im Bereich der distalen Gelenkfläche. In der Wirbelsäule treten durch deutliche Schwärzung die Zwischenwirbelscheiben hervor. So weit man das beurteilen kann, scheinen auch die Markräume der Knochen nun radioaktive Bestandteile zu enthalten; das ist besonders deutlich am Oberschenkelknochen zu erkennen. Durch einen höheren Schwärzungsgrad hebt sich die Speicheldrüse im Bereich des Halses ab, durch geringere Schwärzung das Zentralnervensystem und der Fettkörper am Rücken.

Bei der zweiten Exposition desselben Schnittes, die nach 15 Monaten erfolgte, waren die Unschärfen wesentlich vermindert und die Aktivität in den Zwischenwirbelscheiben nicht mehr so deutlich auszumachen. Dagegen erscheint das Zentralnervensystem stärker markiert, und eine auffällige Umlagerung ist am Hoden aufgetreten, der in stärkerer Vergrößerung in Abbildung 28 und 29 noch einmal dargestellt ist.



Abb. 28



Abb. 29

Abb.28 = 1.Exposition, Abb.29 = 2.Exposition. Hoden
Abb.28 u. 29: Ausschnitt aus den Autoradiogrammen einer
Maus, 18,5 g, getötet 1 1/2 Std. nach
oraler Applikation von $52,76 \cdot 10^6$ T.p.m.
± 102 mg ^{14}C -Hexamin/kg.

Nach der 1. Exposition sieht man eine diffuse Verteilung des strahlenden Materials, das den Eindruck hervorruft, daß die Samenkanälchen mehr ^{14}C enthalten, als das interstitielle Gewebe. Bei der 2. Exposition stellt sich scharf abgegrenzt eine wabige Struktur dar. Jetzt haben vor allem die Septen zwischen den Hodenkanälchen eine Schwärzung hervorgerufen, während innerhalb der Kanälchen keine Radioaktivität zu erkennen ist.

Auch 3 Stunden nach der Verabfolgung findet sich die größte Konzentration von radioaktiver Substanz in der Blase (Abb. 30 und 31).

Die Leber und die Speicheldrüse treten deutlich hervor. Die Kontraste sind vielleicht noch etwas stärker geworden. Ebenso ist in der Markzone des Oberschenkelknochens Radioaktivität enthalten, während die Corticalis nicht markiert ist. Der Fettkörper am Rücken hat wie bei den anderen Tieren wenig ^{14}C aufgenommen. Auffallend ist nun eine fleckförmige, scharf abgegrenzte Schwärzung im Pleura-raum. Diese größeren und zum Teil auch sehr kleinen, aber besonders stark markierten Stellen sind sehr schwer einer bestimmten anatomischen Struktur zuzuordnen. Sie liegen wohl in den Pleuraspalten, und man könnte sich denken, daß es vielleicht Lymphgefäße oder Lymphknötchen sind. Auf der 2. Exposition nach 15 Monaten sind diese fleckförmigen Schwärzungen ebenfalls in gleicher Intensität zu erkennen, obwohl die Unschärfe des Bildes von der 1. Exposition weitgehend verschwunden ist.

Nach 4 Stunden hat sich die Verteilung nicht wesentlich gewandelt (Abb. 32 und 33). Man sieht wiederum die deutliche Markierung der Leber. Hier ist nun auch die Niere getroffen, die über der Rinde mehr Schwärzung zeigt als über dem Mark. Der stark markierte Organabschnitt dicht über dem Beckeneingang gehört dem Dickdarm an, der an dieser Stelle einen Kotballen enthält, in dem eine hohe ^{14}C -Konzentration vorhanden ist. Die fleckförmige Schwärzung über den Pleuraspalten ist auch hier auffällig zu erkennen.



Abb. 30 = 1. Exposition SU P T PC C HF



Abb. 31 = 2. Exposition

Abb. 30 u. 31: Autoradiogramme eines Ganztierschnittes, Maus, 18,5 g, getötet
 3 Std. nach oraler Applikation von $52,76 \cdot 10^6$ T.p.m. Δ 102 mg
 ^{14}C -Hexamin/kg.

- SU = Gl. sublingualis
- P. = Gl. parotis
- T = Thymus
- PC = Pankreas
- C = Colon
- H = Hoden
- F = Femur

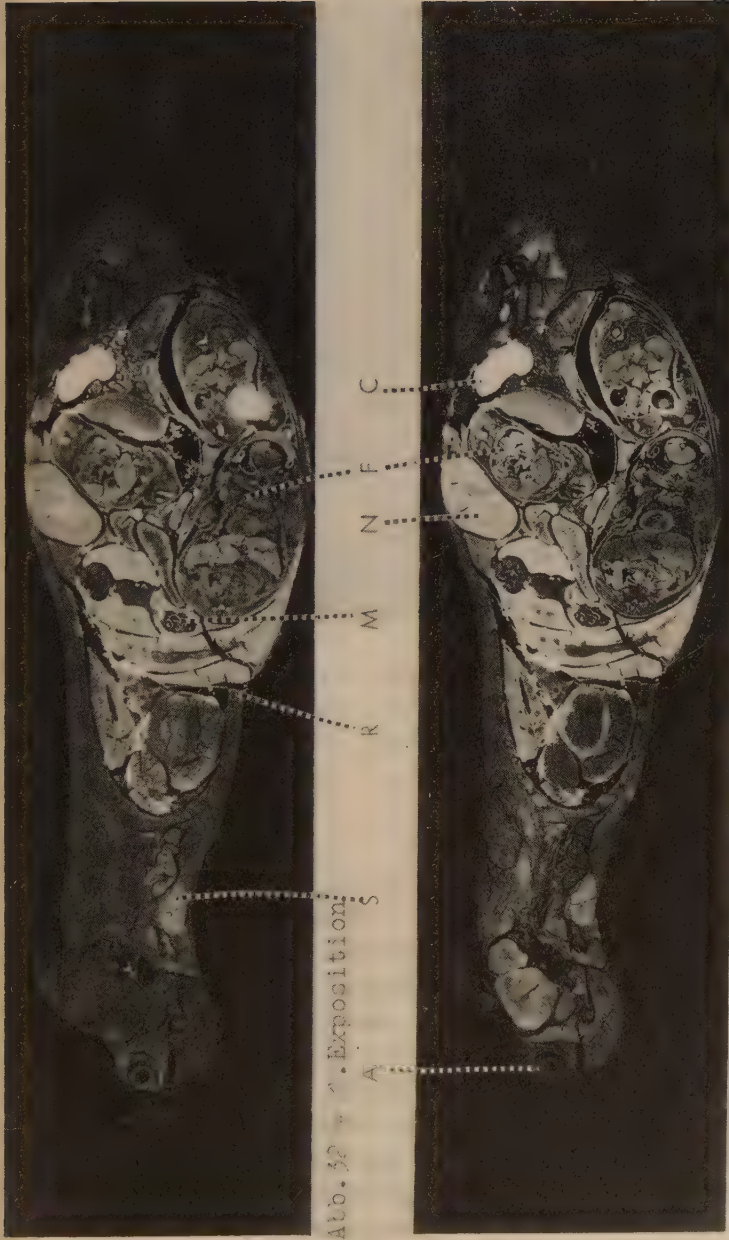


Abb. 32 u. 33: Autoradiogramme eines Ganztierschnittes, Maus, 44 g, getötet
4 Std. nach oraler Applikation von $46,6 \cdot 10^6$ T.p.m. $\wedge$ 38 mg
 ^{14}C -Hexamin/kg.

A = Auge	N = Niere
S = Speicheldrüse	F = Foeten
R = Rippe	C = Colon
M = Magen	

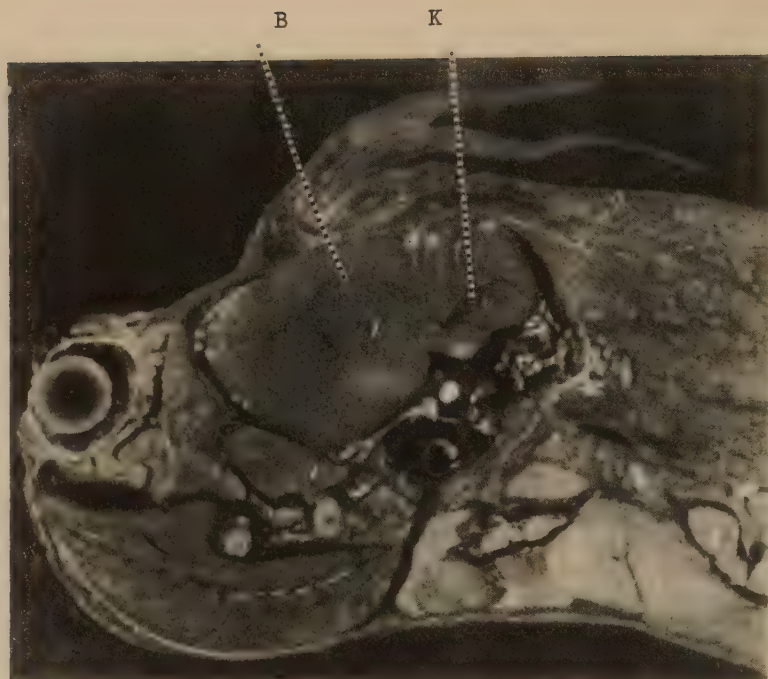


Abb. 34: Gehirn einer Maus, 44 g, getötet 4 Std. nach oraler Applikation von $46,6 \cdot 10^6$ T.p.m. Δ 38 mg ^{14}C -Hexamin/kg. 1. Exposition
B = Balken
K = Kleinhirnwurm

Zusätzlich sind ähnliche Flecken auch im Bauchraum auszumachen.

Die drei, auf diesem Schnitt getroffenen Foeten, zeigen eine starke Markierung der Knochenanlagen und eine hervortretende Schwärzung über der Leber. In der Placenta ist die Konzentration an ^{14}C nicht sehr hoch, aber die Bilder zeigen, daß sie für Hexamin gut durchlässig ist.

Bei diesem letzten Schnitt wurde das Auge des Tieres getroffen, in dem die Verteilung auf der in Abbildung 34 gezeigten Vergrößerung recht gut ausgemacht werden kann. Der ^{14}C befindet sich erstens in der Bulbuswand, der sich als scharfer schmaler Streifen deutlich von der Umgebung abhebt. Selbstverständlich kann nicht entschieden werden, in

welcher Schicht der radioaktive Kohlenstoff abgelagert ist. Zweitens sieht man aber Schwärzungen über den Randpartien des Glaskörpers, während das Zentrum frei davon ist. Die Verteilung mit der dichtesten Schwärzung in der Peripherie spricht dafür, daß radiomarkierte Verbindungen von außen in den Glaskörper eindiffundiert sind.

Man kann auf diesem Bild auch sehen, wie inhomogen der radioaktive Kohlenstoff über das Gehirn ausgebreitet ist. Die weiße Substanz ist offenbar viel weniger markiert als die graue Substanz, in der eine ausgesprochen feinfleckige Musterung vorherrscht.

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß zugeführter Formaldehyd im Körper sehr schnell zu Ameisensäure oxydiert wird. Das geht aus den Ameisensäurebestimmungen im Blut nach intravenöser Injektion von ^{14}C -markiertem Formaldehyd hervor. Zweieinhalb Minuten nach der Injektion sind 70 % des ^{14}C in der Ameisensäure zu finden. Da die Versuche mit ^{14}C -markierter Ameisensäure ergaben, daß zu diesem Zeitpunkt praktisch noch keine markierten Metaboliten im Blut vorhanden sind, könnte das restliche Drittel des ^{14}C noch in der Form des freien Formaldehyds vorliegen, oder, was wahrscheinlicher ist, ein Teil des Formaldehyds müßte direkt und schneller als Ameisensäure in andere Verbindungen übergegangen sein. Freier Formaldehyd kann, wie JAENICKE (8) begründet darstellt, in der Zelle direkt mit Tetrahydrofolsäure zu aktiviertem Formaldehyd kondensiert werden. In dieser Form vermag er leicht in weitere Stoffwechselreaktionen einzutreten und kann z.B. zur Serinsynthese verwendet werden.

Zweitens war zu fragen, wo die Oxydation zu Ameisensäure stattfindet. Die Antwort darauf ergibt sich aus den in-vitro-Versuchen. Schon zwei Minuten nach Beginn der Inkubation von Formaldehyd mit Blut lag der gesamte markierte Kohlenstoff in der Ameisensäure vor. Wurde Formaldehyd dagegen mit Blutplasma inkubiert, dann entstand in dieser kurzen Zeit keine Ameisensäure. Folglich sind die Blutzellen für die Oxydation des Formaldehyds erforderlich. Zu der gleichen Schlußfolgerung kamen auch MALORNY, RIETBROCK und SCHNEIDER (9), aber sie fanden eine viel geringere Oxydationsgeschwindigkeit. Bei ihren Versuchen mit Hundeblut war nach 30 Minuten erst die Hälfte des Formaldehyds zu Ameisensäure oxydiert worden. Da MALORNY, RIETBROCK und SCHNEIDER (9) ein anderes Analysenverfahren benutzten, bei dem eine Wasserdampfdestillation erforderlich ist, liegt es nahe, die Diskrepanz der Resultate

darauf zurückzuführen. Nur fragt sich, welche Ergebnisse richtig sind und mit den anderen Beobachtungen im Einklang stehen. Bei den eigenen Untersuchungen stellte sich heraus, daß die Ausscheidung von markiertem CO_2 über die Lunge und von markierter Ameisensäure, markiertem Harnstoff und markiertem Allantoin mit dem Harn nach der intravenösen Injektion von radiomarkiertem Formaldehyd sowohl nach ihrem zeitlichen Verlauf als auch nach ihrer Menge so verläuft, als wäre radioaktive Ameisensäure gegeben worden. Die Daten deuten darauf hin, daß nur in den während der ersten Minuten aufgefangenen Harnportionen freier Formaldehyd enthalten ist. Auch die Verteilung des markierten Kohlenstoffes im Körper, die sich auf das gesamte Körperwasser erstreckt, ist bei beiden Stoffen etwa gleich. Somit muß die Formaldehydoxydation im Organismus außerordentlich rasch erfolgen. Damit ist nicht erwiesen, wo sie stattfindet. Wenn die Ergebnisse von MALORNY, RIETBROCK und SCHNEIDER (9) zuträfen, müßte der Formaldehyd in allen Geweben zunächst schnell zu Ameisensäure oxydiert werden und die entstandene Ameisensäure müßte nahezu vollständig wieder aus den Zellen heraustreten. Sonst wäre die gemessene Höhe der Ameisensäurekonzentration des Blutes und die davon abhängige Ausscheidung mit dem Harn nicht zu erklären. Zwar ist nicht auszuschließen, daß der Formaldehyd diesen Weg nimmt, aber die Befunde sind einfacher zu deuten, wenn man annimmt, daß die Oxydation im Blut erfolgt. Die eigenen in-vitro-Untersuchungen liefern eindeutige Belege für diese letzte Hypothese, die übrigens auch MALORNY, RIETBROCK und SCHNEIDER (9) für zutreffend halten, obwohl ihre Analysen den Schluß deshalb nicht erlauben, weil sie eine zu langsame Reaktionsgeschwindigkeit ergaben. Deshalb nahmen die Autoren an, daß die Oxydation des Formaldehyds durch die Erythrocyten innerhalb des Körpers schneller abläuft als außerhalb des Organismus.

Die Ameisensäure verschwindet aus dem Blut mit einer Halb-

wertzeit von 5 1/2 Minuten. In vitro trat im Rattenblut im Laufe von 10 Minuten keine Abnahme der Ameisensäure ein. Der Stoffwechsel der Ameisensäure müßte also in der Organen, in erster Linie wohl in der Leber, stattfinden.

In größter Menge entsteht CO_2 . Sie wird zum überwiegenden Teil abgeatmet. In den eigenen Versuchen betrug dieser Anteil ca. 40 % von der als Ameisensäure oder Formaldehyd zugeführten Dosis. Dagegen fanden PLAUT, BETHEL und LARDY (10) nur 25 % nach Ameisensäureinjektion, und in einer neueren Arbeit gibt NEELY (11) 82 % nach Formaldehydinjektion an. In beiden Fällen war die Applikation intraperitoneal erfolgt. Jedoch kann die Applikationsweise nicht für diese Differenzen verantwortlich sein, denn die in Abbildung 6 dargestellten Versuche zeigten, daß die CO_2 -Abgabe nach oraler, intravenöser und intraperitonealer Applikation etwa gleich ist. Der Wert von NEELY (11) erscheint sehr hoch, denn REGOECZI (12) fand selbst nach intravenöser Injektion von ^{14}C -Bicarbonat nur 75 % davon als CO_2 in der Ausatemungslust. Er verwendete allerdings Kaninchen, so daß seine Ergebnisse nur mit Vorbehalt mit den bei Ratten gewonnenen Ergebnissen verglichen werden können.

Auch bezüglich der Elimination der Ameisensäure aus dem Blut ergibt sich eine Diskrepanz zu den Resultaten von MALORNY, RIETBROCK und SCHNEIDER (9), die eine Halbwertszeit von 80 - 85 Minuten feststellten. Jedoch haben sie ihre Untersuchungen am Hund durchgeführt, so daß hier ein Speziesunterschied vorliegen könnte.

Die entstandene Kohlensäure wird nicht restlos abgeatmet, sondern außerdem für bestimmte Synthesen verwendet. Der Einbau in den Harnstoff ist von REGOECZI (12) quantitativ erfaßt worden. Er fand 2-3 % des als Bicarbonat intravenös verabfolgten Kohlenstoffes im Harnstoff wieder. Der stärkste Einbau erfolgte in den ersten 10 - 15 Minuten und findet nur in der Leber statt. In den eigenen

Versuchen mit ^{14}C -Formaldehyd und ^{14}C -Ameisensäure trat im Harn markierter Harnstoff auf. Außerdem war das Allantoin markiert, das ein wesentliches Endprodukt im Stoffwechsel der Purine darstellt. Die Markierung der Purine kann entweder direkt über die aktivierte Ameisensäure, indirekt über daraus entstandenes Glycin oder, wie BUCHANAN, SONNE und DELLUVA (13) diskutierten, über CO_2 , der direkt in die 6-Position eingebaut werden könnte, stattfinden.

Im gleichen Sinne deuteten MAC LEOD und LARDY (14) Versuche an Ratten, die, unter Biotinmangel gehalten, weniger CO_2 zur Purinbildung verwenden. Biotin kann unter ATP-Spaltung CO_2 aufnehmen und auf andere Substrate übertragen, d.h. Biotin aktiviert CO_2 . Das ist gleichzeitig die Reaktion, über welche CO_2 zur Malonsäurebildung verwendet wird, die zur Synthese der Fettsäuren notwendig ist und deshalb einen erheblichen Teil des im Körper entstehenden CO_2 verbraucht. Auf dieser Assimilation von Kohlensäure könnte die Markierung von Substanzen beruhen, die sich außer der Ameisensäure im Blut befinden und deren Anteil im Laufe des Versuches größer wird. Außerdem könnten jedoch die Eiweiße und die Phospholipide markiert werden, denn über die aktivierte Ameisensäure wird der Kohlenstoff unter anderem in Serin, in Methionin, in Glycin und in Cholin eingebaut. Über Carbamylphosphat gelangt er in Citrullin und in Arginin und kann auch auf diese Weise in die Eiweiße gelangen.

Einige Befunde weisen darauf hin, daß die Oxydation der Ameisensäure zu CO_2 auf der Stufe der aktivierten Ameisensäure erfolgt. In Versuchen von PLAUT, BETHEL und LARDY (10) wurden ca. 35 % weniger CO_2 gebildet, wenn die Tiere eine Folsäuremangeldiät erhielten und MALORNY (15) fand eine beschleunigte Elimination von Ameisensäure nach mehrtägiger Behandlung mit Folsäure und eine starke Einschränkung der Elimination nach Behandlung mit Aminopterin, einem Antagonisten der Folsäure.

Nun ist noch zu diskutieren, ob der Teil des Formaldehyds, der nicht zu Ameisensäure oxydiert wird, zur Bildung unphysiologischer Produkte führen kann. In den eigenen Versuchen ergab sich dafür kein Anhalt. Aber die verwendeten Formaldehydmengen von 0,85 mg/kg waren auch sehr klein. NEELY (11) hat nach der Verabfolgung einer größeren Dosis, er gab 60,5 mg/kg, ein Reaktionsprodukt zwischen Formaldehyd und Cystein im Harn gefunden, das bei der Dosis von 7 mg/kg nicht vorhanden war. Diese Verbindung könnte erst im Harn entstanden sein, denn sie bildet sich bei Zimmertemperatur, wenn beide Reaktionspartner im gleichen molaren Verhältnis zusammengegeben werden. Dann müßte aber freier Formaldehyd im Harn und damit auch im Blut vorgelegen haben. Dieser Befund stützt somit die schon geäußerte Vermutung, daß ein kleiner Teil des Formaldehyds der Oxydation entgeht und daß in den ersten Minuten nach der intravenösen Applikation auch etwas davon im Harn enthalten sein könnte. Folglich ist bei der Verabfolgung von Formaldehyd mit dem Auftreten unphysiologischer Reaktionsprodukte zu rechnen. Allerdings ist es sehr schwierig die zu erwartenden kleinen Mengen präparativ zu erfassen, damit ihre Struktur ermittelt werden könnte.

Schließlich ist zu erörtern, ob nach der Aufnahme von Hexamin im Körper freier Formaldehyd entsteht. Aus dem Magen-Darm-Trakt wird Hexamin rasch und vollständig resorbiert und zum größten Teil unverändert mit dem Harn ausgeschieden. Der freie Formaldehyd, der im Harn gefunden wurde, ist sicher erst in den ableitenden Harnwegen entstanden, denn sonst hätte in größerer Menge radiomarkierte CO_2 abgeatmet werden müssen. Die kleine Menge markierter Kohlensäure, die anfangs in der Ausatemluft erscheint, kann auf eine Spaltung des Hexamins im Magen zurückgeführt werden. Würde nämlich im Blut eine Hydrolyse stattfinden, dann müßte die Ausscheidung von markiertem CO_2 allmählich zunehmen, und nicht, wie gefunden wurde, geringer werden. Die Spaltung des Hexamins

im Harntrakt ist die Grundlage für seine therapeutische Anwendung bei Harnwegsinfektionen. Darauf beruht aber auch die Nierenschädigung, die nach hohen Dosen bei Kaninchen und Hunden gefunden wurde (16). Für die Beurteilung der Duldbarkeit von Hexamin zur Lebensmittelkonservierung ist dieser Punkt deshalb wichtig, weil erst erwiesen werden müßte, ob die langfristige und ständig wiederholte Einwirkung von kleinen Mengen Formaldehyd die Niere oder die ableitenden Harnwege schädigt oder nicht.

Ein Teil des als Hexamin zugeführten Kohlenstoffes bleibt längere Zeit im Körper zurück. Dabei handelt es sich um 4-5 % von der applizierten Menge. Auf den Autoradiogrammen der Ganztierschnitte ist zu erkennen, daß keine gleichmäßige Verteilung vorliegt. Die Hauptmenge findet sich in den Ausscheidungsorganen Leber und Niere. Verhältnismäßig stark sind auch die Speicheldrüsen markiert. Darüber hinaus sind aber einige auffällige Lokalisationen besonders zu erwähnen, die nicht mit der Elimination in Zusammenhang gebracht werden können. Das ist erstens das Auge. Man findet in der Bulbuswand und im Glaskörper radioaktive Ablagerungen. Zweitens ist der Hoden relativ stark markiert, und durch Zufall wurde bei einer Maus während des Versuches Ejakulat entleert, das eine sehr hohe Konzentration radioaktiven Kohlenstoffes enthielt. Drittens finden sich ungewöhnliche Ansammlungen markierter Produkte im Pleura-raum und in der Bauchhöhle, die kleinere und größere Punkte auf dem Autoradiogramm hervorrufen. Diese Erscheinung ist nur bei den Tieren zu sehen, die erst drei und vier Stunden nach der Applikation getötet wurden. Bestimmten Organstrukturen können diese Markierungen nicht zugeordnet werden. Morphologisch finden sich an den gleichen Stellen sehr feine und lockere, faserartige Gebilde, die wahrscheinlich zu den serösen Häuten gehören. Vielleicht handelt es sich um Lymphgefäße oder um Lymphknötchen, in denen radioaktives Material hängen geblieben ist oder phagocytiert wurde. Das wäre ein Hinweis darauf, daß

eventuell doch Eiweiße durch die Reaktion mit Formaldehyd denaturiert worden sind, die dann hier abgelagert würden. Kleine Mengen Hexamin könnten innerhalb der Zellen oder an sonstigen Stellen des Gewebes, an denen der Formaldehyd nicht oxydiert werden kann, gespalten worden sein. Infolgedessen könnten dort formylierte Proteine entstehen, die, als körperfremde Stoffe phagocytiert, in die Lymphknoten gelangen und dort abgelagert werden. Auffallend ist ferner die geringe Markierung des Depotfettes und des Zentralnervensystems. Das beruht wahrscheinlich auf der im Verhältnis zur Wasserlöslichkeit schlechten Löslichkeit des Hexamins in Lipoiden.

Um zu klären, in welcher Form der kleine Anteil des radioaktiven Kohlenstoffes vorliegt, der nicht wie das unveränderte Hexamin unmittelbar ausgeschieden wird, müßten die Gewebe durch fraktionierte Extraktion näher untersucht werden.

Eine abschließende Beurteilung über die Duldbarkeit von Formaldehyd und Hexamin gestatten die Ergebnisse dieser Arbeit noch nicht.

ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen an Ratten nach intravenöser Injektion von Ameisensäure und Formaldehyd, deren Kohlenstoff radioaktiv markiert war, ergaben:

1. Formaldehyd wird im Blut zum überwiegenden Teil zu Ameisensäure oxydiert.
2. Die Halbwertszeit der Ameisensäure im Blut beträgt 5 1/2 Minuten.
3. In vitro werden 0,6 µg Formaldehyd in 0,5 ml Blut, das von Mensch, Hund und Ratte stammt, innerhalb von 2 Minuten vollständig zu Ameisensäure umgewandelt. Im Plasma findet diese Oxydation nicht statt.
4. Der größte Teil der Ameisensäure wird zu CO₂ weiter oxydiert, so daß ca. 40 % des verabfolgten Kohlenstoffes in der Ausatemungsluft nachzuweisen sind.
5. Mit dem Harn werden nur 4-6 % eliminiert. In den ersten Minuten ist die Radioaktivität vorwiegend in der Ameisensäure enthalten, später in anderen Verbindungen, von denen die quantitativ wichtigsten als Harnstoff und Allantoin erkannt wurden.
6. Nach der Injektion von 0,85 mg Formaldehyd/kg entgehen etwa 30 % wahrscheinlich der Oxydation zu Ameisensäure. Ein Teil davon könnte direkt mit Tetrahydrofolsäure zu aktiviertem Formaldehyd gekoppelt werden. Wahrscheinlich wird eine kleine Menge als freier Formaldehyd während der ersten 2-3 Minuten im Harn ausgeschieden.

An Mäusen wurde nach oraler Applikation von ¹⁴C-Hexamin die Radioaktivität in den Ausscheidungen und in den Organen ermittelt. Mit Hilfe der Autoradiografie von Ganztierschnitten konnte die Verteilung des radioaktiven Kohlenstoffes im Tierkörper demonstriert werden.

1. Innerhalb von 3-4 Stunden erscheinen fast 80 % von der applizierten Radioaktivität im Harn. Der größte Teil davon ist unverändertes Hexamin. Außerdem findet sich aber auch freier Formaldehyd im Harn, der durch Hydrolyse von Hexamin in den Harnwegen entstanden sein muß.
2. Nur 2 % des oral als Hexamin zugeführten ^{14}C ließen sich in Form von $^{14}\text{CO}_2$ in der Ausatemungsluft nachweisen.
3. 4 % des verabfolgten Kohlenstoffes sind nach 22 Stunden noch im Tierkörper enthalten.
4. Autoradiogramme von Ganztierschnitten zeigen, daß sich die Radioaktivität im Tierkörper nicht gleichmäßig verteilt. Die Exkretionsorgane Leber, Niere, Darm und Speicheldrüsen sind stark markiert. Außerdem enthalten das Nebennierenmark, der Hoden und das Auge relativ viel Radioaktivität. Im Depotfett und im Nervensystem findet sich wenig ^{14}C . Die Autoradiogramme der Schnitte von Tieren, die erst 3 und 4 Stunden nach der Applikation getötet wurden, weisen punktförmige Schwärzungen im Pleuraraum und in der Bauchhöhle auf, die sich nicht einwandfrei bestimmten anatomischen Strukturen zuordnen lassen.
5. Hexamin dringt bei trächtigen Tieren in die Foeten ein und ist, auch dort besonders in der Leber, außerdem aber in den Knochenanlagen festzustellen.

Literatur

1. KUSCHINSKY, K.U.
Enterale Resorption, Verteilung und Ausscheidung
von Formaldehyd bei Ratten und Mäusen.
Diss. Med. Fak. Freie Universität, Berlin 1965
2. TRENDELENBURG, P.
Quantitative Messungen über die Spaltung des
Hexamethylentetramins.
Biochem. Zschr. 95:146(1919)
3. ULLBERG, S.
Studies on the Distribution and Fate of ³⁵S-Labelled
Benzyl-Penicillin in the Body.
Acta radiol. (Stockholm) Suppl. 118:1(1954)
4. LANGECKER, H.
Die Verteilung von Hexamethylentetramin auf die
Phasen des Blutes, Liquor, Kammerwasser und
Pericardflüssigkeit beim nierenlosen Hund.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Path. Pharmak. 221:166
(1954)
5. ANTONACOPOULOS, N.
Vorschläge zur quantitativen Bestimmung des Form-
aldehyds im Bindegewebe des Fleisches und seiner
Zubereitungen.
Diss. München 1957
6. FRISELL, W.R., MACKENZIE, C.G.
The Determination of Formaldehyde and Serine in
Biological Systems.
Meth. Biochem. Anal. 6:63(1958)
7. HESTRIN, S.
The Reaction of Acetylcholine and other Carboxylic
Derivatives with Hydroxylamine, and its Analytical
Application.
J. Biol. Chem. 180:249(1949)

8. JAENICKE, L.

Die Folsäure im Stoffwechsel der Einkohlenstoff-Einheiten.

Angew. Chem. 73:449(1961)

9. MALORNY, G., RIETROCK, N., SCHNEIDER, M.

Die Oxydation des Formaldehyds zu Ameisensäure im Blut, ein Beitrag zum Stoffwechsel des Formaldehyds. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Exp.Path.Pharmak. 250:419(1965)

10. PLAUT, G.W.E., BETHEL, J.J., LARDY, H.A.

The Relationship of Folic Acid to Formate Metabolism in the Rat.

J. Biol. Chem. 184:795(1950)

11. NEELY, W.B.

The Metabolic Fate of Formaldehyde-¹⁴C Intraperitoneally Administered to the Rat.

Biochem. Pharm. 13:1137(1964)

12. REGOECZI, E.

Über die Bestimmung des Harnstoffumsatzes in vivo.

Klin. Wschr. 43:1127(1965)

13. BUCHANAN, J.M., SONNE, J.C., DELLUVA, A.M.

Biological Precursors of Uric Acid.

J. Biol. Chem. 173:81(1948)

14. MAC LEOD, P.R., LARDY, H.A.

Metabolic Functions of Biotin.

J. Biol. Chem. 179:733(1949)

15. MALORNY, G.

Kinetik der Formaldehyd- und Ameisensäure-Oxydation bei verschiedenen Tier-Species.

Naunyn-Schmiedebergs Arch.Exp.Path.Pharmak., 1966, im Druck

16. TRENDLENBURG, P.

Hexamethylentetramin (Urotropin).

Heffters Handbuch der Experimentellen Pharmakologie, 1:534(1923) Springer-Verlag, Berlin

Herrn Prof. Dr. med. H. Kewitz danke ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas, für seine ständige Bereitschaft zu klärenden Diskussionen, sowie für die Anleitung bei der Abfassung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. med. J. Buß, der mich durch vielfältigen Rat bei dem Erlernen und Durchführen der Experimente unterstützte.

Lebenslauf

Am 22. März 1939 wurde ich, Eva Schlede, als Tochter des Kaufmanns Robert Schlede und seiner Ehefrau Klara, geb. Gickler, in Berlin geboren.

Von 1945-1949 besuchte ich die Grundschule in Blankenfelde, Kreis Zossen und von 1950-1951 die Franziskus-Oberschule in Berlin-Schöneberg. Bis 1953 war ich Schülerin der Zentralschule in Blankenfelde. Anschließend besuchte ich die Liebfrauenschule, ein neusprachliches Gymnasium in Berlin-Charlottenburg, wo ich im Februar 1959 meine Reifeprüfung ablegte.

Im Mai 1959 begann ich mit dem Studium der Veterinär-Medizin an der Freien Universität Berlin. Am 10. April 1961 bestand ich die tierärztliche Vorprüfung. Mein Studium schloß ich am 31. März 1964 mit dem Staatsexamen ab.

Seit dem 1. April 1964 bin ich als Assistentin am Institut für Veterinär-Pharmakologie und -Toxikologie tätig.

